

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III 



**LAS PROTEÍNAS CON DOMINIO BRO1 DE LA
RUTA “PAL”: SU PAPEL EN LA TRANSDUCCIÓN
DE LA SEÑAL DE PH EN “ASPERGILLUS
NIDULANS”.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Antonio Galindo Revilla

Bajo la dirección del doctor

Miguel Ángel Peñalva Soto

Madrid, 2010

- **ISBN: 978-84-693-0663-5**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



Las proteínas con dominio Bro1 de la ruta *pal* : su papel en la transducción de la señal de pH en *Aspergillus nidulans*.



Memoria presentada por Antonio Galindo Revilla para optar al grado de Doctor.

Director de Tesis:

Miguel Ángel Peñalva Soto
Prof. de investigación del C.S.I.C.
Centro de Investigaciones Biológicas
C.S.I.C

Tutora:

Covadonga Vázquez Estévez
Departamento de Microbiología III
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

TESIS DOCTORAL
ANTONIO GALINDO REVILLA
2009



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del CSIC bajo la dirección del Dr. **Miguel Ángel Peñalva Soto**, Profesor de Investigación del CSIC y coordinador de la Unidad de Genética Molecular de *Aspergillus* del CIB.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección general de Investigación a través del proyecto BIO2003-00077 y una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia al doctorando **Antonio Galindo Revilla**.

Malheureux les hommes qui ont toutes les idées claires.

(Desgraciados los hombres que tienen todas las ideas claras).

Louis Pasteur.

A Gala y a la “Negra”

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AD	Dominio de activación
AMSH	“Associated molecule with the SH3 domain of STAM”
ATP	Adenosina-5’-trifosfato
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
cDNA	Acido desoxirribonucleico codificante
CHMP	Charged Multivesicular body Protein
CPS	Carboxipeptidasa S
CPY	Carboxipeptidasa Y
DBD	Dominio de unión al DNA
DID	Degradación independiente de Doa4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DUB	Deubiquitinasa
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
EGFP	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
PGE	Endosoma post-Golgi
PVE	Endosoma prevacuolar
ESCRT	“Endosomal sorting complex required for transport”
GFP	Proteína verde fluorescente
GGA	“Golgi-localised, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding”
GLUE	“GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45”
GST	Glutation tiotransferasa
HECT	Homólogo al extremo carboxilo terminal de la proteína E6-AP
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
MCA	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
MFA	Medio de fermentación de <i>Aspergillus</i>
MIM	“MIT interacting motif”
MIT	“Microtubule-interacting and trafficking”
MMA	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>

MVB	“Multivesicular body”
NLS	Señal de localización nuclear
NZF	Dominio dedos de zinc
ONPG	o-nitrophenil β -D-galactopiranosido
ORF	Pauta abierta de lectura, “open reading frame”
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PtdIs	Fosfatidilinositol
p/v	peso/volumen
RING	“Really interesting new gene finger”
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SD	Medio sintético de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	“ <i>Saccharomyces</i> genome database”
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor”
TCA	Ácido tricloroacético
TMD	Dominio transmembrana
TPR	“tetratricopeptide repeat”
UBPY	Proteína deubiquinasa Y
UEV	“ubiquitin E2 variant”
UIM	Motivo que interacciona con ubiquitina
UTR	Region no traducida
v/v	volumen/volumen
WMM	Medio mínimo de microscopía
YPDA	Medio completo de levaduras

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	1
1.2 La ruta endocítica en hongos	
1.3 Función de los complejos ESCRT-III en la biogénesis de los MVBs	5
1.3.1 Las proteínas Vps de clase E	7
1.3.1.1 ESCRT-0	7
1.3.1.2 ESCRT-I	9
1.3.1.3 ESCRT-II	11
1.3.1.4 ESCRT-III	11
1.3.1.4.1 Formación del complejo ESCRT-III	12
1.3.1.4.2 Desensamblaje de los complejos ESCRT	14
1.3.1.4.3 Deubiquitinación del cargo	15
1.3.2 Otras funciones de los complejos ESCRT	16
1.4 La transducción de señal de pH alcalino. Función de los complejos ESCRTs	17
1.4.1 Regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental en <i>A. nidulans</i>	17
1.4.2 Genes implicados en la regulación por pH ambiental	18
1.4.2.1 Genética formal de la regulación por pH ambiental en <i>A. nidulans</i>	18
1.4.3 El factor de transcripción PacC	20
1.4.3.1 Activación de PacC	20
1.4.3.2 Localización subcelular de PacC	21
1.4.4 Aspectos fisiológicos controlados por la regulación por pH ambiental dependiente de PacC/Rim101	22
1.4.4.1 La ruta RIM en <i>S. cerevisiae</i>	22
1.4.4.2 La ruta RIM en <i>Candida albicans</i>	23
1.4.4.3 La regulación de pH y la patogenicidad	23
1.4.5 Modelo de la ruta de transducción de la señal de pH en <i>Aspergillus nidulans</i> , la ruta pal	24
1.4.5.1 El complejo de señalización por pH ambiental de la membrana plasmática	24
1.4.5.2 El complejo de señalización por pH ambiental asociado a la membrana del endosoma	25
1.4.5.3 Modelo de señalización por pH ambiental	26
1.4.6 La doble función del complejo ESCRT-III	28
1.4.7. Reclutamiento de las proteínas del complejo inferior a las membranas de los endosomas: el dominio MIT y el dominio Bro1	29
1.5 La maquinaria de los complejos ESCRT en la citocinesis	30
2. OBJETIVOS	37

3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Medios para <i>Aspergillus nidulans</i>	41
3.1.1 Medio completo (MCA)	41
3.1.2 Medio mínimo (MMA)	41
3.1.3 Medio de fermentaciónm (MFA)	41
3.1.4 Solución de sales y suplementos para medios de <i>A. nidulans</i>	42
3.1.5 Ajuste del pH en medios de <i>A. nidulans</i> en condiciones no estándar	43
3.2 Medios para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.2.1 Medio completo de levadura (YPD e YPDA)	43
3.2.2 Medio mínimo de levadura (SD)	44
3.2.3 Solución de sales y suplementos para medios de <i>S. cerevisiae</i>	44
3.3 Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	45
3.4 Cepas de microorganismos utilizadas	45
3.4.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	45
3.4.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
3.4.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	47
3.5 Vectores utilizados	48
3.5.1 Plásmidos utilizados para la transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	48
3.5.2 Plásmidos utilizados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.5.3 Plásmidos utilizados la expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	52
3.5.4 Generación de casetes mediante PCR's de fusión	52
3.5.5 Oligonucleótidos	54
3.6 Manejo de <i>Aspergillus nidulans</i>	57
3.6.1 Mantenimiento y cultivo de estirpes	57
3.6.2 Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	57
3.6.3 Aislamiento de DNA	58
3.6.4 Extracción de proteínas totales de <i>Aspergillus nidulans</i>	59
3.6.5 Cultivos para la detección de proteínas expresadas bajo el control de su propio promotor o del promotor de <i>gpdA</i>	60
3.6.6 Cultivos para la expresión de proteínas bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa (<i>alcA^p</i>)	60

3.6.7 Obtención de transformantes con transgenes integrados en los locis <i>argB</i> o <i>pyroA</i>	61
3.6.8 Obtención de transformantes con un transgén integrado en el locus <i>vps32</i>	62
3.6.9 Obtención de alelos mutantes en <i>palC</i>	62
3.6.10 Cruces entre estirpes de <i>Aspergillus</i>	63
3.6.11 Genotipado de estirpes mediante PCR	63
3.6.12 Análisis fenotípicos de la ruta de pH mediante crecimiento en medio sólido	64
3.7 Manejo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.7.1 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.7.2 Extractos proteicos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.7.3 Sistema de doble híbrido	66
3.7.3.1 Obtención de estirpes con distintas combinaciones de plásmidos	66
3.7.3.2 Detección cualitativa de la interacción entre dos proteínas	66
3.7.3.3 Detección cuantitativa de la actividad β -galactosidasa	67
3.7.4 Análisis fenotípico de <i>ygr122w</i> Δ	68
3.8 Técnicas de biología celular	68
3.8.1 Ensayos de inmunodetección de proteínas: “western-blot”	68
3.8.2 Clonaje de cDNA de <i>A. nidulans</i>	69
3.8.3 Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	69
3.8.4 Ensayos de “Pull down”	70
3.8.4.1 Marcaje de proteínas con ^{35}S -Met	70
3.8.4.2 Ensayos de pull down con extractos de <i>E. coli</i> y proteínas marcadas con ^{35}S -Met	70
3.8.4.3 Ensayos de pull down con extractos de <i>E. coli</i>	71
3.8.4.4 Ensayos de pull down con extractos de <i>A. nidulans</i>	72
3.9 Microscopía de fluorescencia	72
3.9.1 Condiciones de cultivo y medios de observación al microscopio	73
3.9.2 Medios para el cultivo de estirpes con transgenes que se expresan bajo el control del promotor del gen <i>gpdA</i> o bajo el promotor del gen <i>alcA</i>	73
3.9.3 Experimentos de cambio de pH	74
3.9.4 Experimentos de marcaje <i>in vivo</i> con FM4-64	74
3.9.5 secuencia de imágenes “time lapse”: determinación de la velocidad de los endosomas.	75
3.10 “Kits” de biología molecular y bioquímica utilizados	75
3.11 Productos radiactivos	76
3.12 Reactivos y enzimas de biología molecular	76
3.13 Alineamientos de secuencias	76
 4. RESULTADOS	 77

Capítulo I	79
4.1 PalC juega un papel clave en el procesamiento proteolítico de PacC	81
4.1.1 La proteína PalC es necesaria para que se produzca el corte proteolítico señalizador	81
4.1.2 la activación de la ruta <i>pal</i> no causa modificaciones post-traduccionales evidentes o incremento en la síntesis de PalC	82
4.2 PalC interacciona con componentes del complejo ESCRT-III	84
4.2.1 Definición del Dominio Bro1 amino terminal de PalC	84
4.2.2 Caracterización de los componentes del ESCRT-III en <i>A nidulans</i>	85
4.2.3 PalC interacciona en doble híbrido con Vps32, Vps20 y Vps4	86
4.2.4 Análisis cuantitativo de las interacciones de doble híbrido de PalC	93
4.2.5 Sustituciones y deleciones de un único aminoácido previenen la unión de PalC con Vps32	97
4.3 Caracterización de la interacción de PalC con Vps32	99
4.3.1 PalC es un interactor directo de Vps32	99
4.3.2 PalA es la segunda de las proteínas de la ruta <i>pal</i> que une directamente a Vps32	102
4.4 Localización subcelular de PalC	104
4.4.1 Cambios en la localización subcelular de PalC en función del pH ambiental	104
4.4.2 La localización subcelular de PalC en estructuras corticales depende del receptor de 7-TMD, PalH, pero no de PalA	111
4.4.3 Efecto de las mutaciones que afectan a la unión de PalC con Vps32 en la localización de PalC::GFP.	112
4.4.4 Las mutaciones <i>palI15</i> y <i>palI32</i> tienen efectos distintos en la localización de PalC::GFP	116
4.5 Aproximación a la caracterización de las estructuras de PalC	119
4.5.1 PalC::GFP se localiza en estructuras corticales asociadas a membrana plasmática	122
4.5.2 Las mutaciones <i>didbΔ</i> o <i>rabaΔ</i> no afectan a la localización de PalC en estructuras corticales	123
4.5.3 Localización de Vps32	126
4.5.4 Vps32::GFP interacciona con PalC	128
4.5.5 La sobreexpresión de Vps32 no afecta a la localización de PalC::GFP	129
4.6 El motivo di-tirosina C-terminal	131
4.6.1 La delección o la sustitución de las ditirosinas C-terminales de PalC por alaninas causa un fenotipo muy leve de mimesis de acidez	132
4.6.2 El procesamiento de PacC ⁷² en la cepa <i>palc301</i>	133
4.7 YGR122Wp es el ortólogo de PalC en <i>S. cerevisiae</i>	135

Capítulo II	137
	137
4.8 Localización subcelular de PalA	137
4.8.1 La activación de la ruta pal no causa modificaciones post-traduccionales evidentes o incremento en la síntesis de PalA	140
4.8.2 Cambios en la localización subcelular de PalA en función del pH ambiental	142
4.8.3 La localización subcelular de PalA en estructuras corticales depende del receptor de 7-TMD, PalH pero no de palb.	143
4.8.4 PalA está asociado a los endosomas tardíos, los núcleos y a la membrana de vacuolas	144
4.8.5 PalA está asociado al “spindle pole body”, el centro organizador de microtúbulos en hongos	147
5. DISCUSIÓN	149
	1
5.1 El dominio Bro1 de PalC	149
5.2 Interacción entre el complejo ESCRT-III y los componentes de la ruta <i>pal</i>	152
5.3 La respuesta de PalC y PalA a la alcalinización del pH ambiental	156
5.3.1 La respuesta de PalC a la alcalinización del pH ambiental	156
5.3.2 La respuesta de PalC en un fondo genético <i>palI</i>	158
5.3.3 Localización de Vps32	161
5.3.4 La respuesta de PalA a la alcalinización del medio	165
5.3.5 La región C-terminal de PalC	167
5.3.6 La localización de PalA en el núcleo	168
5.4 Modelo de procesamiento de PacC	170
6. CONCLUSIONES	177
7. BIBLIOGRAFÍA	181
8. ANEXOS	200

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPERGILLUS NIDULANS

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente a la clase *Ascomycetes*, orden *Plectomycetes*^{1,2}. Sus células vegetativas crecen por extensión apical formando largos filamentos ramificados, denominados hifas, que se entrecruzan formando una red o micelio. Las hifas contienen varios núcleos, generalmente haploides, y están segmentadas mediante septos perforados que permiten el tránsito de nutrientes entre los distintos compartimentos. *A. nidulans* es un hongo homotático cuyas hifas pueden entrar en contacto y fusionarse (anastomosis) intercambiando así material citoplásmico y nuclear. Si la anastomosis ocurre entre dos hifas genéticamente distintas se forma un heterocarionte (Figura I.-1 A), es decir, una estirpe cuyas hifas contienen los núcleos haploides de ambas estirpes parentales³. El ciclo de vida de *A. nidulans* aparece esquematizado en la Figura I.-1 A. El crecimiento polarizado, la septación que divide las hifas, y la capacidad de éstas de secretar al exterior enzimas hidrolíticas, que participan en la degradación y absorción de nutrientes, permiten al hongo adaptarse y colonizar distintos ambientes.

A. nidulans es uno de los hongos filamentosos considerado como organismo modelo. Como hongo homotático constituye el modelo genético de referencia para otros miembros asexuales del género *Aspergillus* de gran interés en la industria, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en patogénesis, como *A. fumigatus*. A esta característica se une su enorme versatilidad metabólica, que ha permitido la caracterización de numerosas rutas del metabolismo primario y secundario. La conservación entre *Aspergillus* y metazoos de ciertos procesos enzimáticos y de determinadas rutas de biosíntesis y de degradación ha permitido la identificación de genes implicados en enfermedades metabólicas humanas de origen genético⁴.

El genoma de *A. nidulans* se publicó en diciembre de 2005. Contiene 30 Mpbs organizadas en ocho cromosomas y un número mínimo estimado de poco más de 10.000 genes⁵. La disponibilidad de dicha información es una nueva e importante herramienta de trabajo y supone un avance importante que permitirá seguir utilizando *A. nidulans* como organismo modelo, genéticamente manipulable, en estudios de genética y biología celular y molecular en eucariotas.

1.2 LA RUTA ENDOCÍTICA EN HONGOS

La endocitosis es un proceso celular básico mediante el cual las células eucariotas internalizan membrana plasmática junto con las proteínas asociadas (permeasas, receptores, etc.). Los compartimentos de la ruta endocítica forman una red de orgánulos implicados en multitud de procesos celulares. La endocitosis regula la transducción de señales mediante la internalización de los receptores de membrana como, por ejemplo, el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR, “epidermal growth factor receptor”) en mamíferos

INTRODUCCIÓN

(revisado en Grandal et al. ⁶), y determina, en parte, la composición lipídica de la membrana plasmática. En neuronas, donde la secreción está polarizada, la endocitosis retira el exceso de lípidos de membrana y proteínas de la maquinaria de fusión (como la v-SNARE sinaptobrevina) producido por la fusión de las vesículas sinápticas ⁷.

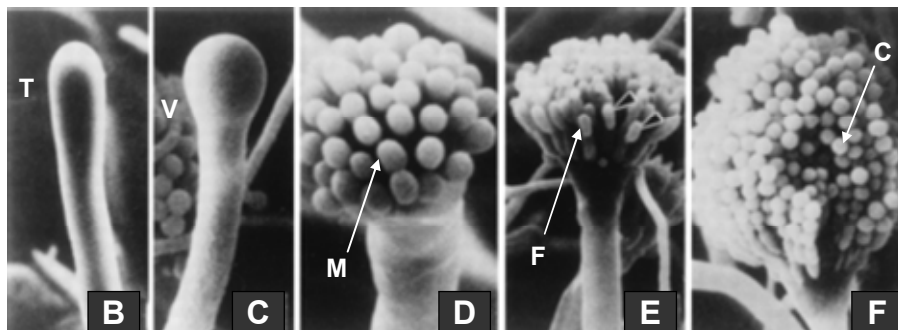
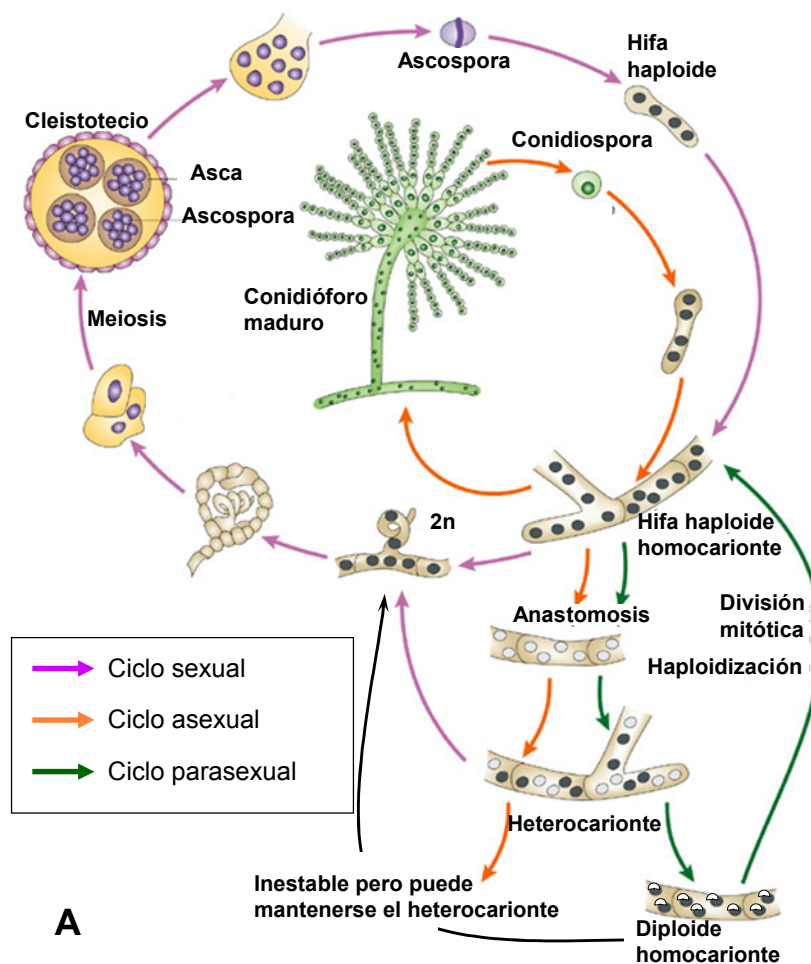


Figura I.-1: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. (A) Tomado de Casselton et al.⁸. El ciclo asexual comienza con la germinación de una espora (conidiospora o ascospora). Las conidiosporas son esporas uninucleadas y haploides, lo que permite detectar la expresión de mutaciones recesivas viables en cada generación. Las conidiosporas se forman en hifas aéreas especializadas, en una estructura compleja denominada conidióforo cuya morfología es característica de los *Plectomycetes* (paneles B-F). El ciclo sexual comienza cuando dos hifas homocarióticas se fusionan por anastomosis y forman una nueva hifa heterocariótica donde los distintos núcleos se sitúan próximos entre sí. Mediante mitosis se produce la división sincronizada de ambos núcleos que, finalmente, se fusionan formando un diploide transitorio que se divide por mitosis. Eventualmente existen células que se dividen por meiosis en estructuras especializadas. Los cuatro productos meióticos resultantes se dividen posteriormente por mitosis para dar lugar a ocho ascosporas haploides. Antes de que las ascosporas maduren totalmente, cada núcleo se divide mitóticamente por segunda vez sin que haya división celular. Debido a este proceso, cada asca madura contiene ocho ascosporas binucleadas, de forma discoidal y con dos características crestas. Los cuerpos fructíferos formados durante la reproducción sexual son estructuras esféricas, denominadas cleistotecios, repletas de ascas. Cuando el cleistotecio se rompe, las ascosporas se liberan para germinar e iniciar un nuevo ciclo de vida vegetativo. *A. nidulans* puede atravesar un ciclo de vida denominado parasexual donde, tras la anastomosis de dos hifas, dos núcleos se fusionan y se forma una estirpe diploide. La dotación cromosómica "n" se restablece por haploidización, suceso poco frecuente que puede inducirse mediante agentes "antimicrotúbulos" como la p-fluorofenilalanina o el benomilo. En este proceso se produce intercambio cromosómico y recombinación mitótica entre los núcleos parentales para dar lugar a un nuevo núcleo genéticamente distinto a sus predecesores². (B-F) Cambios morfológicos durante la formación del conidióforo. Fotografías de microscopía electrónica de barrido mostrando los distintos estadios de conidiación. (B) Tallo (t) de un conidióforo inmaduro en un estadio anterior a la formación de la vesícula. (C) Conidióforo inmaduro en el que se está formando la vesícula (v). (D) Desarrollo de las médulas (m). (E) Desarrollo de las filídas (f). (F) Conidióforo maduro en el que pueden apreciarse las cadenas de conidiosporas (esporas asexuales) (e). Tomado de Timberlake et al.⁹

La endocitosis comienza con un paso de "internalización", en el cual se forma una vesícula endocítica en la membrana plasmática. Las proteínas que se encuentran en la membrana de esta vesícula pueden ser recicladas desde los compartimentos endosomales a la membrana plasmática o, alternativamente, seguir la ruta degradativa que acaba con la destrucción de estas proteínas por las proteasas del lumen de la vacuola en hongos, o de su equivalente en metazoos el lisosoma. En cualquier caso, las proteínas cargo deben pasar a través de diferentes compartimentos que están interconectados gracias al tráfico de membranas que se establece entre ellos.

En *S. cerevisiae* se pueden distinguir, desde un punto de vista funcional, tres tipos de compartimentos endocíticos: vacuolas y dos estadios distintos de endosomas que, aunque tradicionalmente se han denominado como endosomas "tempranos" y endosomas "tardíos", no está claro que se correspondan con los endosomas tempranos y tardíos de metazoos¹⁰. Las vesículas que se forman por endocitosis de la membrana plasmática (Figura I.-2, flecha 1) alcanzan un compartimento alimentado con membranas procedentes del Golgi, por lo que comparte características de los endosomas y del Golgi (Figura I.-2, flecha 1). Dicho compartimento, denominado endosoma post-Golgi (PGE)¹⁰, sería funcionalmente equivalente al endosoma temprano de metazoos. El PGE, al igual que el *trans*-Golgi, se caracteriza por la presencia en su membrana de la syntaxina (t-SNARE) Tlg2p [las proteínas de membrana t-SNAREs median el anclaje entre membranas al interaccionar con las proteínas v-SNAREs (revisado en Leabu et al.¹¹)]. Las proteínas que llegan al PGE pueden volver al Golgi y, desde allí, reciclar nuevamente a la membrana plasmática por la ruta biosintética (Figura I.-2, flechas 4 y 10), o progresar hacia un segundo compartimento endosomal¹² (Figura I.-2, flecha 5), que se caracteriza por la presencia en su membrana de la syntaxina (t-SNARE) Pep12p y por la adquisición progresiva del fosfolípido fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns(3)P)¹³. Este compartimento se denomina endosoma prevacuolar (PVE)¹⁰. En el PVE convergen las rutas endocítica y biosintética, dado que recibe tráfico de la ruta biosintética procedente del Golgi [e.g. la proteasa carboxipeptidasa Y (Cpyp) del lumen vacuolar] (Figura I.-2, flecha 6) y cargos endocíticos que han de ser degradados en la vacuola. El PVE madura dando lugar a un orgánulo con vesículas intralumenales (ILVs) que

INTRODUCCIÓN

se forman por la invaginación de su membrana (Figura I.-2, flecha 8). Dicho orgánulo se denomina cuerpo multivesicular (multivesicular body, MVB). En la fase final de su maduración los MVBs se fusionan a las vacuolas. Los cargos que permanecen en la membrana del PVE y no se incorporan en las vesículas pueden llegar a la membrana de la vacuola [como en el caso de la carbopeptidasa S (Cpsp)] o ser reciclados a la membrana plasmática, mientras que los cargos que se encuentran en las ILVs de los MVBs (e.g Cpyy) llegan al lumen de la vacuola ¹⁴ (Figura I.-2, flecha 9). Existe además tráfico desde el PVE al Golgi, que es necesario para que las proteínas residentes del Golgi, como el receptor de la Cpyy, Vps10p, que media la salida de la Cpyy del Golgi hacia el PVE, regresen nuevamente al Golgi ¹⁴ (Figura I.-2, flecha 7). El PVE puede también recibir tráfico de la membrana plasmática (Figura I.-2, flecha 2) y, asimismo, existe evidencia de reciclaje de cargos proteicos desde este compartimento endosomal directamente a membrana plasmática ¹⁰ (Figura I.-2, flecha 11).

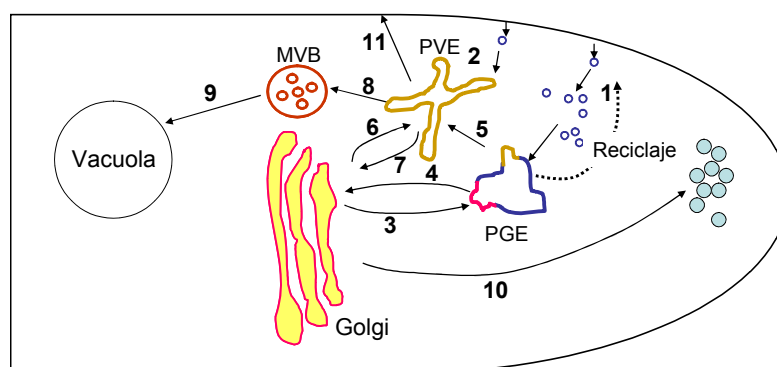


Figura I.-2: Representación esquemática del tráfico de membranas en *Aspergillus nidulans*. Flecha 1: endocitosis desde la membrana plasmática al endosoma post-Golgi (PGE); flecha 2: endocitosis desde la membrana al endosoma prevacuolar (PVE); flecha 3: tráfico anterógrado desde el Golgi al PGE; flecha 4: tráfico retrógrado desde el PGE al Golgi; flecha 5: tráfico entre el PGE y el PVE; flecha 6: ruta biosintética desde el Golgi al PVE; flecha 7: tráfico retrógrado desde el PVE al Golgi; flecha 8: maduración del PVE en cuerpos multivesiculares (MVB); flecha 9: fusión homotípica de los MVBs entre ellos o con la vacuola; flecha 10: ruta de secreción desde el Golgi a la membrana plasmática; flecha 11: ruta de secreción desde el PVE a la membrana.

Cada una de estas conexiones está estrechamente regulada y depende de proteínas adaptadoras que clasifican y reclutan los cargos que han de ser transportados entre los distintos compartimentos. En *S. cerevisiae* se han identificado cinco complejos proteicos que funcionan como adaptadores: el complejo AP-1, que participa, al menos, en el transporte entre el Golgi y la membrana plasmática; el complejo AP-2, que participa en el transporte entre la membrana plasmática y el compartimento endosomal; el complejo AP-3 que regula el transporte desde el Golgi a la vacuola sin pasar a través del PVE ^{14,15} y el retrómero, un complejo heteropentamérico, que media el transporte retrógrado desde el PVE al Golgi ^{16,17}. Por último, en el caso del transporte entre el Golgi y el PVE participan las proteínas GGAs (Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding), que son adaptadores monoméricos que reconocen cargos ubiquitinados en la membrana del Golgi y median su incorporación en vesículas recubiertas de clatrina para ser transportados al PVE ^{18,19}.

Debido a la interconexión entre los distintos compartimentos endosomales y a que el proceso de “maduración” de los endosomas es progresivo, es difícil diferenciar los compartimentos morfológicamente. Por tanto, los compartimentos se suelen clasificar utilizando como marcadores proteínas de membrana ^{20,21} (e.g. SNAREs) ²². El PGE y el Golgi contienen la syntaxina Tlg2p, el PVE contiene la syntaxina Pep12p y las vacuolas contienen la syntaxina Vam3p. Las distintas formas del fosfatidilinositol (PI) confieren también identidad de membrana a los compartimentos: el compartimento endosomal se caracteriza por contener PtdIns(3)P ¹³; las membranas del Golgi por contener PtdIns(4)P ²³ y la membrana plasmática por contener PtdIns(4,5)P. El flujo de membranas producido por la ruta biosintética y la ruta endocítica hace necesario que actúen determinadas kinasas y fosfatasas para mantener la correcta distribución de los fosfoinosítidos ^{24,25}. Otra de las características de los compartimentos endosomales es que están divididos en “dominios” de membrana definidos por proteínas “organizadoras” de tales dominios, que no son homogéneos en cuanto a su composición lipídica o proteica. Las proteínas Rabs, elementos claves en la formación de dichos dominios, son GTPasas monoméricas que reclutan efectores que cambian la composición lipídica y/o proteica de la membrana y, por ende, su identidad, o bien participan en el transporte de vesículas de un compartimento a otro (revisado en Pfeffer et al. y Zerial et al. ^{26,27}).

En la Figura I-2 se muestra una versión adaptada a *A. nidulans* del modelo propuesto por Hugh Pelham para levaduras ¹⁰. En el caso de *A. nidulans*, el crecimiento polarizado conlleva un predominio de la exocitosis en el extremo en crecimiento de la hifa lo que genera un exceso de membrana en el ápice. Este exceso de membrana se internaliza por endocitosis en una zona subapical denominada “anillo endocítico” donde se concentra la maquinaria, dependiente de actina, de internalización endocítica cuando la extensión apical es muy rápida ^{28,29}.

1.3 FUNCIÓN DE LOS COMPLEJOS ESCRTs EN LA BIOGÉNESIS DE LOS MVBs

La degradación específica de proteínas es un mecanismo fundamental para la regulación de ciertos procesos ³⁰. Las proteínas solubles se marcan con una cadena de ubiquitinas para su degradación por el proteasoma, una proteasa no vacuolar. La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraduccional mediante la cual un polipéptido de 76 aminoácidos, la ubiquitina, se une al grupo ε-amino de uno o varios residuos de lisina en el sustrato diana. Cuando dicha lisina pertenece a otra molécula de ubiquitina, se forma entonces una cadena de poliubiquitina (revisado en Pickart et al. y Hettema et al. ^{31,32}). Las proteínas poliubiquitinadas, con cadenas de ubiquitinas formadas por unión a la Lys 48 de unas ubiquitinas con otras, son reconocidas por las subunidades reguladoras del proteasoma y degradadas por la subunidad catalítica ³³.

Sin embargo, la degradación de la mayoría de las proteínas transmembrana es diferente. Estas proteínas también se ubiquitinan pero, en este caso, bien mediante la unión covalente a uno o más residuos de lisina de su región citosólica a una sola molécula de ubiquitina, o bien mediante la adición de cadenas cortas de ubiquitina unidas entre sí por su Lys 63 ³⁴⁻³⁶. Estas proteínas ubiquitinadas son reconocidas por una serie de adaptadores que contienen dominios de unión a ubiquitina y que dirigen su transporte a través de los compartimentos endosomales hasta la vacuola, donde serán degradadas (Figura I-3 (1)). Este proceso no sólo está implicado en la degradación

INTRODUCCIÓN

de proteínas (ruta endocítica). Las hidrolasas del lumen vacuolar también se ubiquitinan en el Golgi para llegar a la vacuola (ruta biosintética) ¹⁴.

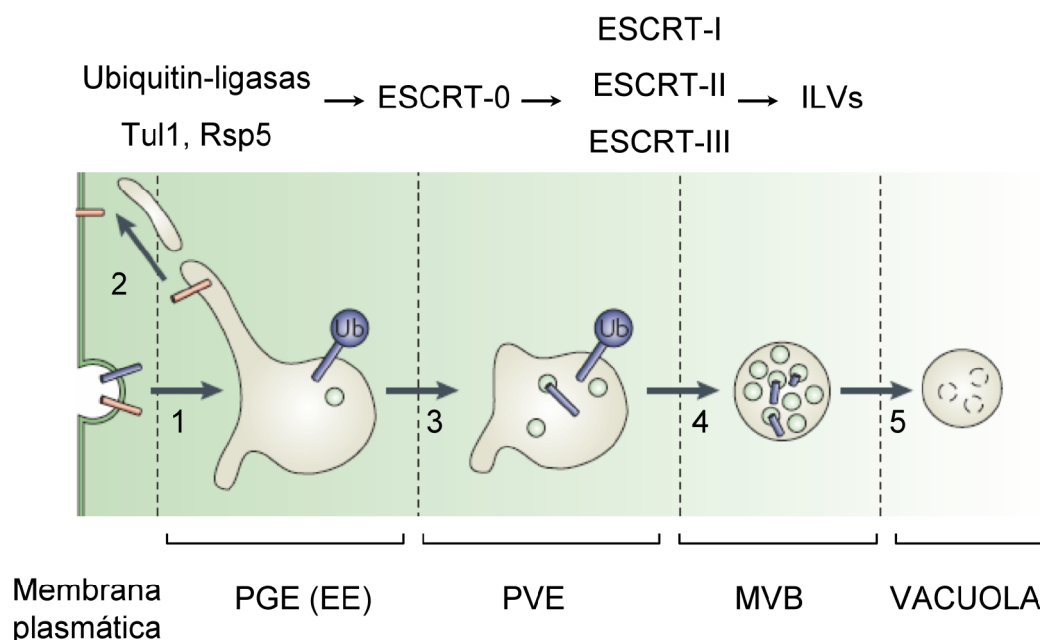


Figura I-3: Esquema idealizado de las distintas ramas de la ruta endocítica. Las proteínas transmembrana se internalizan mediante vesículas endocíticas que se fusionan con los endosomas tempranos Post Golgi (PGE) (1). Tanto los cargos que van a ser degradados como los que van a ser reciclados de nuevo a membrana llegan al PGE. Los cargos que vuelven a la membrana plasmática son incorporados en endosomas de reciclaje (2). La monoubiquitinación u oligoubiquitinación con cadenas cortas de ubiquitina unidas por su Lys 63 marca a los cargos que van ser degradados. En *S.cerevisiae* las proteínas Tul1p y Rsp5p son ubiquitin-ligasas que participan en la ubiquitinación de dichos cargos (3). Estos son reconocidos por los complejos de la ruta del MVB (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) e incorporados en las vesículas intraluminales (ILVs) características de los MVBs (4). Finalmente, los MVBs se fusionan con la vacuola. La progresión desde las formaciones tubulovesiculares del PGE a la vacuola viene marcada por el reemplazamiento en la membrana del endosoma de unas Rabs por otras (Rab5 por Rab7 en el caso de mamíferos) y por el aumento de PtdIns(3)P. Modificado de Williams et al. ³⁷

La degradación de las proteínas transmembrana que llegan al sistema endosomal siguiendo la ruta endocítica o biosintética necesita que, antes de la fusión del PVE con la vacuola, se formen los MVBs (Figura I-3 (3)), que contienen en su lumen las ILVs. La fusión de los MVBs con la vacuola libera las ILVs al lumen vacuolar, lo que permite que tanto la membrana que forma las ILVs como las proteínas que contiene sean degradadas (Figura I-3 (4) y (5)), mientras que las proteínas que se encuentran en la membrana externa de los MVBs, tras la fusión con la vacuola, permanecen en la membrana de ésta. La monoubiquitinación, o la ubiquitinación con cadenas cortas de ubiquitina por unión a la Lys 63, sirve como señal de “sorting” para que las proteínas sean reconocidas como cargos de esta ruta degradativa y sean incorporados en las ILVs ³⁸⁻⁴⁰. No obstante, se han descrito casos de proteínas no ubiquitinadas que son incorporadas a las ILVs sin necesidad de que haya un paso previo de ubiquitinación, como el caso Sna3p en *S. cerevisiae* que entra a formar parte de la ruta gracias a su interacción con la ubiquitin-ligasa citosólica Rsp5 ⁴¹, o como la proteína PMEL17 en los melanosomas ⁴².

1.3.1 LAS PROTEÍNAS Vps DE CLASE E

En *S. cerevisiae* se han identificado más de 60 genes que codifican para proteínas implicadas, a distintos niveles, en el tráfico entre el Golgi y la vacuola ⁴³. Estas proteínas se denominan Vps (vacuolar protein sorting). Tanto la biogénesis de los MVBs como el reconocimiento de las proteínas mono u oligoubiquitinadas como cargos que han de ser incorporados en las ILVs depende de un grupo de estas proteínas, que se conocen como proteínas Vps de clase E ⁴⁴ (Tabla I.-1). La delección de cualquier gen *VPS* de clase E resulta en el bloqueo de la formación de los MVBs y en la acumulación de los cargos en la membrana de los endosomas prevacuolares, dando lugar al “compartimento de clase E”. El “compartimento de clase E” consiste, en *S. cerevisiae*, en un acúmulo de endosomas aberrantes, carentes de vesículas internas, que se apilan formando cisternas ⁴⁴⁻⁴⁶. La caracterización de las proteínas Vps permitió identificar cuatro complejos multiproteicos que se reclutan de forma transitoria y secuencial desde el citoplasma a la membrana del PVE, que se conocen como complejos ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-0, -I, -II, -III ^{38,39,47}. Estos complejos se encuentran conservados desde hongos hasta mamíferos, aunque es, sin duda, en la levadura *S. cerevisiae* donde posiblemente se ha caracterizado su maquinaria a nivel molecular y atómico con un mayor nivel de detalle ^{48,49}. Según el modelo vigente, los complejos ESCRT funcionan como una cinta transportadora, reclutando de manera secuencial unos complejos a otros y transportando el cargo de un complejo al siguiente ⁵⁰. El complejo ESCRT-0 reconoce al cargo que va a ser internalizado y recluta a ESCRT-I. ESCRT-I interacciona con el cargo y activa a ESCRT-II, que a su vez recluta a ESCRT-III. ESCRT-III concentra el cargo y recluta a proteínas accesorias implicadas en la desubiquitinación del cargo (Doa4) y en el desensamblaje de los complejos ESCRT (Vps4) (Figura I.-4) (revisado en Hurley et al. ⁴⁹).

1.3.1.1 ESCRT-0

En *S. cerevisiae* el complejo ESCRT-0 es un heterodímero formado por las proteínas Vps27p y Hse1p ⁵¹ (Figura I.-4). Este complejo es reclutado a la membrana del endosoma a través de la unión del dominio FYVE (de Fab1, YGL023, Yps27 y EEA1) de Vps27p al PtdIns(3)P ^{13,52,53}. Por otra parte, ESCRT-0 interacciona con los cargos ubiquitinados mediante los motivos de interacción con ubiquitininas (ubiquitin-interacting motifs, UIMs) que poseen tanto Vps27p como Hse1p (Tabla I.-1 y Figura I.-5) ^{54,55}. Otra de las características de Vps27p es que contiene en su región C-terminal el motivo Lys-Ile-Glu-Phe, que es capaz de unirse a la clatrina ⁵⁶, como se ha demostrado en la proteína HRS ⁵⁴, el homólogo en humanos de Vps27p. De hecho, se han observado polímeros de clatrina asociados a los endosomas que contienen a HRS ⁵⁷. La unión a la clatrina serviría para concentrar los cargos y las moléculas de Vps27p en los sitios donde se va a producir la invaginación de la membrana del PVE ⁵⁰. Tanto Vps27p como Hse1p tienen un dominio VHS (Vps27, HRS y STAM) (Tabla I.-1 y Figura I.-5), cuya función se desconoce. No obstante, el homólogo humano de Vps27p es capaz de reconocer como cargo de la ruta de los MVBs ciertos receptores que no están ubiquitinados ⁵⁸, y el dominio VHS es un candidato a reconocer este tipo de cargos.

INTRODUCCIÓN

Complejo	<i>S.cerevisiae</i>	Humanos	Dominio/motivo	Interacción
ESCRT-0				
	Vps7p	HRS	UIM, FYVE, VHS	Ub, PtdIns(3)P, Vps23
	Hse1p	STAM1, STAM2	UIM, VHS, SH3	Ub, Rsp5, Ubp7
ESCRT-I				
	Vps23p	TSG101	UEV	Ub, Vps27
	Vps28p	VPS28		Vps20
	Vps37p	VPS37 A, B, C, D	coiled-coil	
	Mvb12p	-		
ESCRT-II				
	Vps22p	EAP30	coiled-coil	
	Vps25p	EAP25		Vps20
	Vps36p	EAP45	GLUE, NZF	Ub, PtdIns(3)P, Vps28
ESCRT-III				
	Vps2p/Did4p	CHMP2 A, B	coiled-coil	Vps4
	Vps20p	CHMP6	coiled-coil	Vps32, Vps25
	Vps24p	CHMP3	coiled-coil	Vps2, Did2
	Vps32p/Snf7p	CHMP4 A, B, C, D	coiled-coil	Vps20, Bro1
Asociadas a ESCRT-III				
	Vps4p	VPS4 A, B	AAA ATPase, coiled-coil	Vps2, Did2, Vta1
	Bro1p/Vps31p	ALIX	coiled-coil	Vps32, Doa4
	Vps60p/Mos10p	CHMP5	coiled-coil	Vta1
	Did2p	CHMP1 A, B	coiled-coil	Vps4, Vta1
	Doa4p	AMSH		Ub, Bro1
	Vta1p	LIP5		Vps4, Did2, Vps60

Tabla I.-1: Las proteínas Vps clase E. Clasificación de las proteínas Vps clase E organizadas por complejos ESCRTs. Se enumeran las proteínas descritas en *S.cerevisiae* y sus correspondientes ortólogos en humanos. Se indican también los principales dominios o motivos de estas proteínas, así como sus interacciones con proteínas de otros complejos. Ub: ubiquitina.

El ESCRT-0 recluta a ESCRT-I a través de Vps27p, que se une directamente a la proteína del complejo ESCRT-I Vps23p. El motivo Pro-(Ser/Thr)-X-Pro (donde X puede ser cualquier aminoácido) de Vps27p interacciona con el dominio UEV (ubiquitin E2 variant) de Vps23p⁵⁹⁻⁶¹ (Tabla I.-1 y Figura I.-5). Por tanto, las dos características principales del ESCRT-0 en la “ruta del MVB” son seleccionar el cargo y contribuir al reclutamiento a la membrana del endosoma de ESCRT-I. Sin embargo, ESCRT-0 podría tener también un papel en el control de los cargos que van a ser internalizados en las vesículas de los MVBs. Hse1p tiene un dominio SH3 que interacciona con la deubiquitinasa Upb7p⁶² (Tabla I.-1 y Figura I.-5). El papel fisiológico de esta interacción podría estar relacionado con la salida de la ruta de los MVBs de proteínas que habrían sido mono u oligoubiquitinadas⁵⁰.

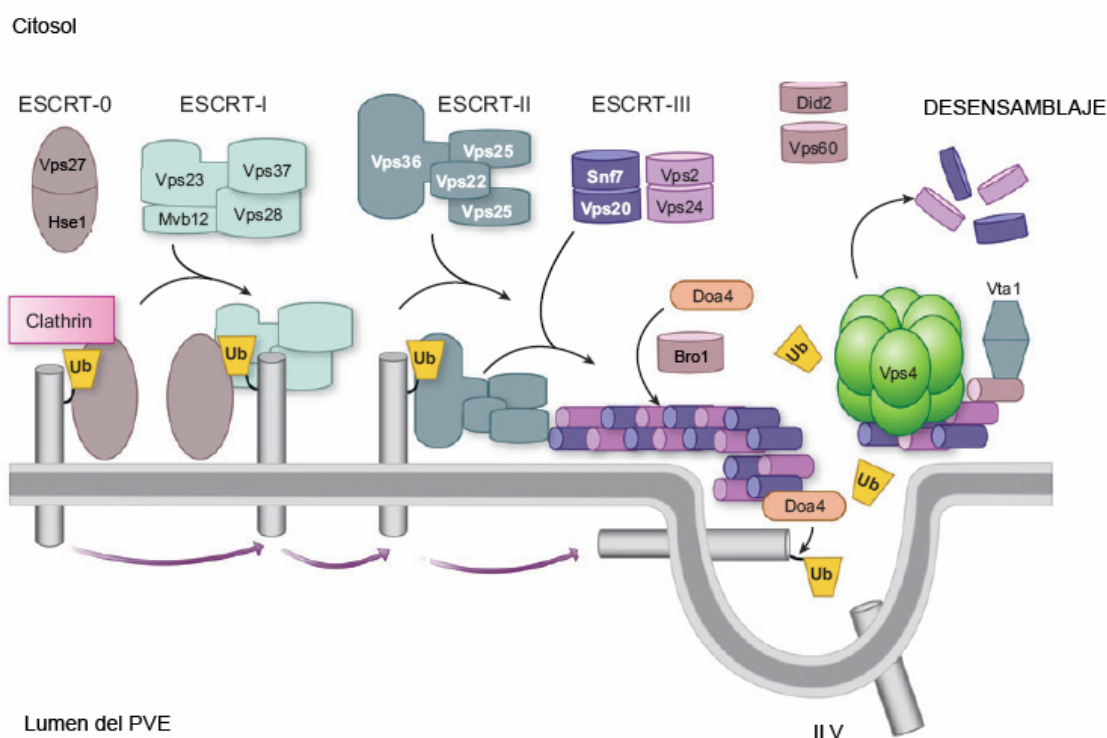


Figura I.-4: La maquinaria de la ruta del MVB. Representación esquemática de la formación de los complejos ESCRTs y del transporte del cargo ubiquitinado para su internalización en las ILVs. En la figura se representa el reclutamiento secuencial de los cuatro complejos a la membrana del endosoma. Este proceso se inicia con la asociación del ESCRT-0 a membranas por la unión a PtdIns(3)P. Vps27p se une a ESCRT-I y, éste a su vez, recluta a ESCRT-II. ESCRT-II activa la polimerización de ESCRT-III en la membrana del endosoma. Toda esta maquinaria se desensambla antes de la formación de los ILVs. El cargo también es transportado de forma secuencial: es reconocido por el ESCRT-0, entonces pasa de éste a ESCRT-I y desde este último a ESCRT-II antes de ser incorporado a las ILVs. Antes de que esto suceda, el cargo es deubiquitinado por la deubiquitinasa Doa4p, reclutada a la membrana del endosoma por su unión con Bro1p, que se asocia al ESCRT-III a través de Vps32. Tomado y modificado de Piper et al.⁴⁸

1.3.1.2 ESCRT-I

En *S. cerevisiae*, el complejo ESCRT-I es un heterotetrámero formado por Vps23p, Vps28p, Vps37p y Mvb12p, que contiene una única copia de cada una de las subunidades^{50,63-67}) (Figura I.-4). La estructura tridimensional del complejo ESCRT-I consiste en una estructura globular, formada por distintas regiones de las proteínas Vps23p, Vps28p y Vps37p, unida a un tallo rígido. El dominio UEV de Vps23p, que se une a la ubiquitina del cargo, se localiza en uno de los extremos de dicho tallo, mientras que el dominio C-terminal de Vps28p (CTD) se encuentra en el otro extremo. A través de esta región C-terminal, Vps28p se une a uno de los dominios NZF (dominios de “dedos de zinc” semejantes a los de la proteína Npl4) de Vps36p, una proteína del complejo ESCRT-II^{65,68} (Tabla I.-1 y Figura I.-5).

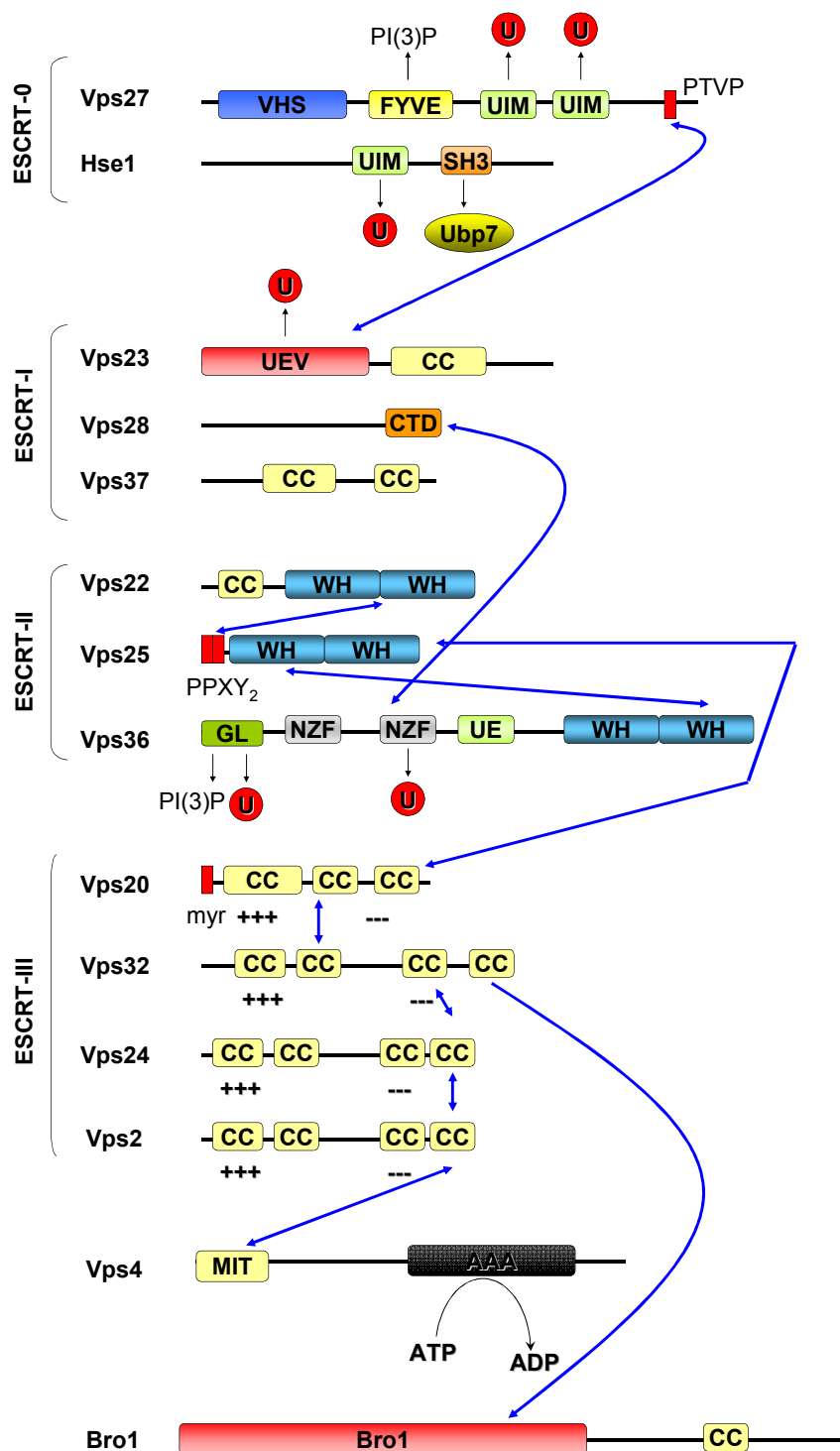


Figura I.-5: Interacciones y dominios de las proteínas de los ESCRTs. Las interacciones proteína-proteína se representan mediante líneas azules. Las interacciones con PtdIns(3)P o con la ubiquitina (U) se indican mediante flechas negras. Las proteínas del ESCRT-III se caracterizan por presentar un carácter bipolar con una región N-terminal rica en residuos básicos (+++ en la figura) y una región C-terminal rica en residuos ácidos (--- en la figura). Mediante esta última región interaccionan con otras proteínas⁵⁰. myr: grupo miristoilo, cc: coiled-coil, WH: winged helix. El resto de los dominios que se indican se corresponde con los mencionados en el texto.

Tanto el dominio UEV de Vps23p, como el CTD de Vps28p, están conectados al tallo rígido por regiones relativamente flexibles, que les permiten unirse a sus respectivos interactores. Sin embargo, el hecho de que el dominio de interacción con el ESCRT-0 y el dominio de interacción con el ESCRT-II estén separados por una estructura rígida, que no permite el acercamiento de la región de interacción con el cargo a la región de unión con ESCRTII, no está de acuerdo con un modelo en el cual el cargo va pasando de un complejo a otro. Debido a esto, se ha llegado a proponer que el complejo ESCRT-I y ESCRT-II se reclutan a la membrana del endosoma al mismo tiempo, o incluso que ambos forman parte de un mismo complejo ⁶³.

La interacción del ESCRT-I con membranas y con la ubiquitina es débil y su reclutamiento a la membrana del endosoma depende casi exclusivamente de Vps27p ⁶³. La función de Mvb12p no está clara, ya que se ha demostrado *in vitro* que la falta de esta proteína no afecta a la unión del resto del complejo a la ubiquitina o a ESCRT-II ⁶³. Se cree que Mvb12p pudiera ser necesaria para el reciclaje del ESCRT-I del endosoma de nuevo al citoplasma, o para la selección de ciertos cargos en la ruta del MVB ^{63,66}.

1.3.1.3 ESCRT-II

En *S. cerevisiae*, el complejo ESCRT-II es un heterotetrámero formado por una copia de las proteínas Vps22p y Vps36p y dos copias de Vps25p (Figura I.-4). En la estructura tridimensional del complejo se observa que estas proteínas se disponen en forma de Y, donde una de las copias de Vps25p forma el tallo, mientras que uno de los brazos está formado por la otra copia de Vps25p, y el otro brazo por Vps22p y la región C-terminal de Vps36p ^{47,69}. En la región N-terminal, Vps36p contiene un dominio GLUE (GRAM-like ubiquitin –binding in EAP45) que une PtdIns(3)P, por lo que ESCRT-II puede reclutarse a la membrana del endosoma de forma independiente de ESCRT-I ⁶⁸. Vps36p contiene, también en la región N-terminal, dos dominios de “dedos de zinc” Npl4 (NZF). Uno de estos dominios, NZF-C, une ubiquitina y el otro, NZF-N, interacciona con Vps28p. Estos dominios relacionan el ESCRT-II con el ESCRT-I, mientras que la región C-terminal de las dos copias de Vps25p es capaz de interactuar con la proteína Vps20p del ESCRT-III ^{70,71} (Tabla I.-1 y Figura I.-5).

1.3.1.4 ESCRT-III

En los complejos descritos anteriormente la estructura atómica está bastante bien caracterizada. Sin embargo, no sucede lo mismo con el ESCRT-III, donde la organización del complejo y la naturaleza de las interacciones entre las proteínas que lo forman, no están descritas con tanto detalle. En *S. cerevisiae* existen seis proteínas que se conocen como “ESCRT-III like proteins”, que tienen un tamaño similar y que se caracterizan por presentar una región N-terminal básica y una región C-terminal ácida (Figura I.-5). Cuatro de estas proteínas forman el “núcleo” del complejo ESCRT-III (Vps32p, Vps20p, Vps2p y Vps24p), mientras que las otras dos (Vps46p/Did2p y Vps60p) se asocian al núcleo del complejo y estarían implicadas en su regulación ^{46,47}. Las cuatro proteínas que forman el núcleo del complejo ESCRT-III están organizadas en dos subcomplejos: el formado por Vps20p y Vps32p, y el formado por Vps2p y Vps24p ^{39,72}.

1.3.1.4.1 Formación del complejo ESCRT-III

En la estructura del cristal de CHMP3, el homólogo en humanos de Vps24p, se observa que la región N-terminal está formada por cuatro α -hélices asimétricas y antiparalelas. Las dos hélices más cercanas al extremo N-terminal presentan un sitio de unión al fosfatidil inositol-3,5-bisfosfato⁷³. Teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia entre las proteínas del ESCRT-III, resulta bastante probable que las otras tres proteínas que forman el núcleo del complejo ESCRT-III tengan una estructura parecida. De hecho, distintos trabajos han demostrado que cada una de las proteínas del ESCRT-III tiene capacidad intrínseca de unirse a membranas, y que esta capacidad está regulada por un dominio autoinhibitorio localizado en la región C-terminal⁷³⁻⁷⁶.

La unión a membranas coincide con el ensamblaje del ESCRT-III, lo que dibuja un modelo en el cual las proteínas del ESCRT-III tendrían una conformación “cerrada” y una conformación “abierta”. En el citoplasma, debido a su carácter bipolar, las regiones básica y ácida interaccionan entre sí formando una región coiled-coil (formada por pares de α -hélices) que se estabiliza mediante interacciones electrostáticas⁵⁰ (Figura I.-5). La proteína adoptaría así una conformación “cerrada”, en la que el dominio C-terminal impediría la unión a la membrana del endosoma. La interacción con uno de los componentes del ESCRT-II o del ESCRT-III desestabilizaría la interacción entre la región básica y la región ácida de la proteína, se produciría un desplazamiento del dominio autoinhibitorio y la proteína adoptaría una conformación “abierta”, lo que permitiría su unión a la membrana del endosoma y el ensamblaje del resto del ESCRT-III.

Vps25p (ESCRT-II) interacciona con el extremo N-terminal de Vps20p^{70,71}. Esta unión puede estabilizarse mediante interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos de la membrana y la región N-terminal básica de Vps20p, o bien por la unión directa de Vps20p a la membrana mediante un grupo miristoilo^{77,78} (Figura I.-5). La unión de la región N-terminal de Vps20p a los fosfolípidos y a Vps25p puede provocar el cambio conformacional en Vps20p de la forma “cerrada” a la forma “abierta”. El ensamblaje del complejo ESCRT-III ocurre de manera secuencial⁷². La unión a membrana de Vps20p parece actuar promoviendo la polimerización de Vps32p, que es la subunidad más abundante en el ESCRT-III⁷². Estos polímeros son filamentos que se disponen en la membrana del endosoma en forma de anillos o espirales que causan cierta deformación de la membrana^{76,77}. Esta deformación de la membrana endosomal podría reflejar el inicio de la invaginación para formar las ILVs. Los oligómeros de Vps32p secuestran los cargos⁷² formando, probablemente, las estructuras en forma de anillos alrededor de dichos cargos, y concentrándolos en estas regiones a modo de dominios de internalización (Figura I.-6 A). *In vitro* se ha demostrado que Vps24p y Vps2p forman también filamentos tubulares^{79,80}. Sin embargo, la estequiometría del complejo ESCRT-III indica que el número de moléculas de Vps24p y Vps2p es menor que el de Vps32p⁷². El papel que juega Vps24p parece estar implicado en el bloqueo de la oligomerización de Vps32p⁷² y en la unión a Vps2p que, a su vez, recluta a la AAA-ATPasa Vps4p^{81,82} para iniciar la disociación del complejo⁸²⁻⁸⁵ (Figura I.-6 A).

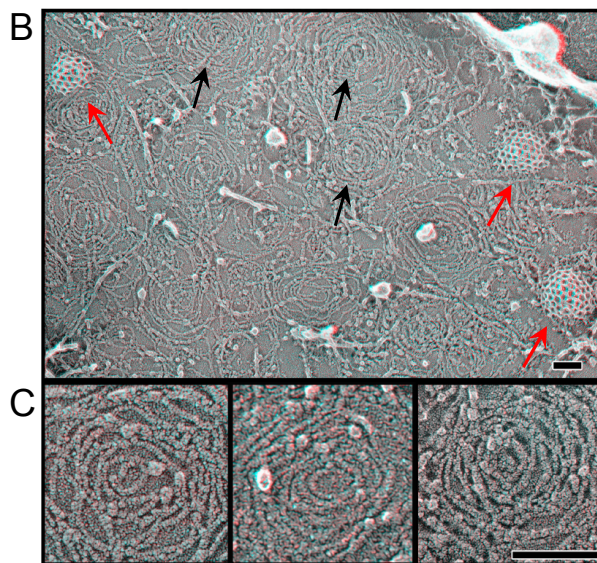
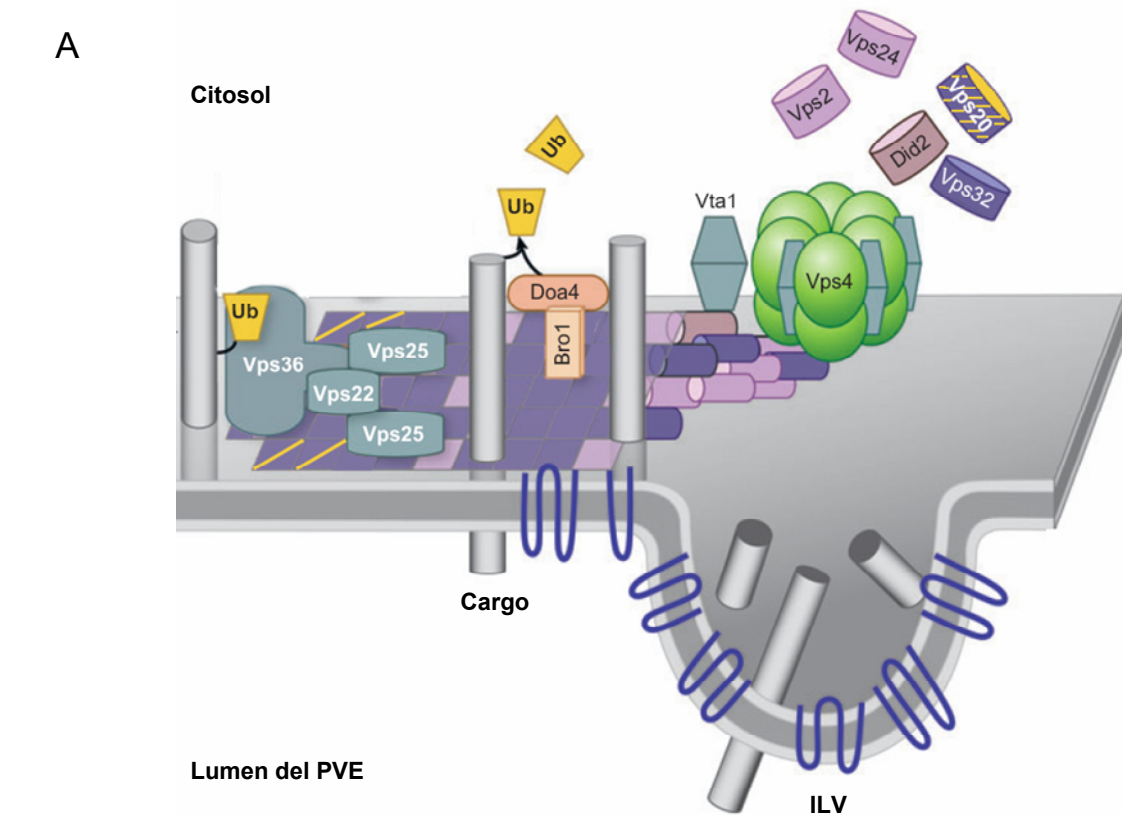


Figura I-6: Polimerización de Vps32 y desensamblaje del ESCRT-III. A) Representación esquemática del ensamblaje del complejo ESCRT-III. Vps25 ayudaría al reclutamiento a la membrana del endosoma de Vps20 (cuadrados morados con rayas), que activa la oligomerización de Vps32 (cuadrados morados), la subunidad más abundante del ESCRT-III. Los oligómeros de Vps32 forman estructuras espirales en la membrana, donde queda retenido el cargo ⁷², que es deubiquitinado por Doa4 antes de ser internalizado. Estas estructuras circulares podrían favorecer la invaginación de la membrana para formar los ILVs ⁷². Vps24 (cuadrados violetas) ⁷² se une a los oligómeros de Vps32 y actuaría impidiendo la polimerización de Vps32 y reclutando a Vps2 (cuadrados violetas), que a su vez une a Vps4 que desensambla el complejo. Los componentes se liberan al citoplasma para ser reutilizados en nuevos ciclos de selección de cargo. B-C) Reconstrucción tridimensional de imágenes tomadas con un microscopio electrónico. En las imágenes se observa la cara citosólica de la membrana plasmática de células humanas que sobreexpresan la proteína Flag-CHMP4A, homóloga a Vps32p. Debido a la sobreexpresión, Flag-CHMP4A se localiza en membrana plasmática, además de en las membranas de los endosomas. En la imagen B) tomada de la Figura.-2 de Hanson ⁷² se observan las estructura circulares (flechas negras), junto con puntos donde se ha producido el ensamblaje de moléculas de clatrina (flechas rojas) C) Detalles de las estructuras circulares formadas por Flag-CHMP4A. Las barras representan 100 nm. Tomado de Hanson et al. ⁷⁶

1.3.1.4.2 Desensamblaje de los complejos ESCRT

La disociación de la membrana de los complejos ESCRT es dependiente de energía: La AAA-ATPasa Vps4p es la encargada de liberar los componentes de los complejos ESCRT al citoplasma para ser utilizados en futuros ciclos de formación de ILVs ^{46,83,86,87}. La delección de Vps4p provoca la acumulación de los componentes de los complejos ESCRT en la membrana endosomal, el bloqueo de la internalización de los cargos en las ILVs y la formación de un “compartimento de clase E”. Vps4p se encuentra formando dímeros en el citoplasma. En presencia de ATP, Vps4p oligomeriza formando un complejo proteico que contiene 12 subunidades organizadas en dos anillos hexaméricos ^{83,88,89}. Tras la hidrólisis del ATP, el oligómero Vps4 se desensambla y se disocia de la membrana endosomal liberando a su vez los componentes de los ESCRTs ^{83,88,90}. No se ha descrito en detalle el mecanismo por el cual se produce el desensamblaje del complejo ESCRT-III.

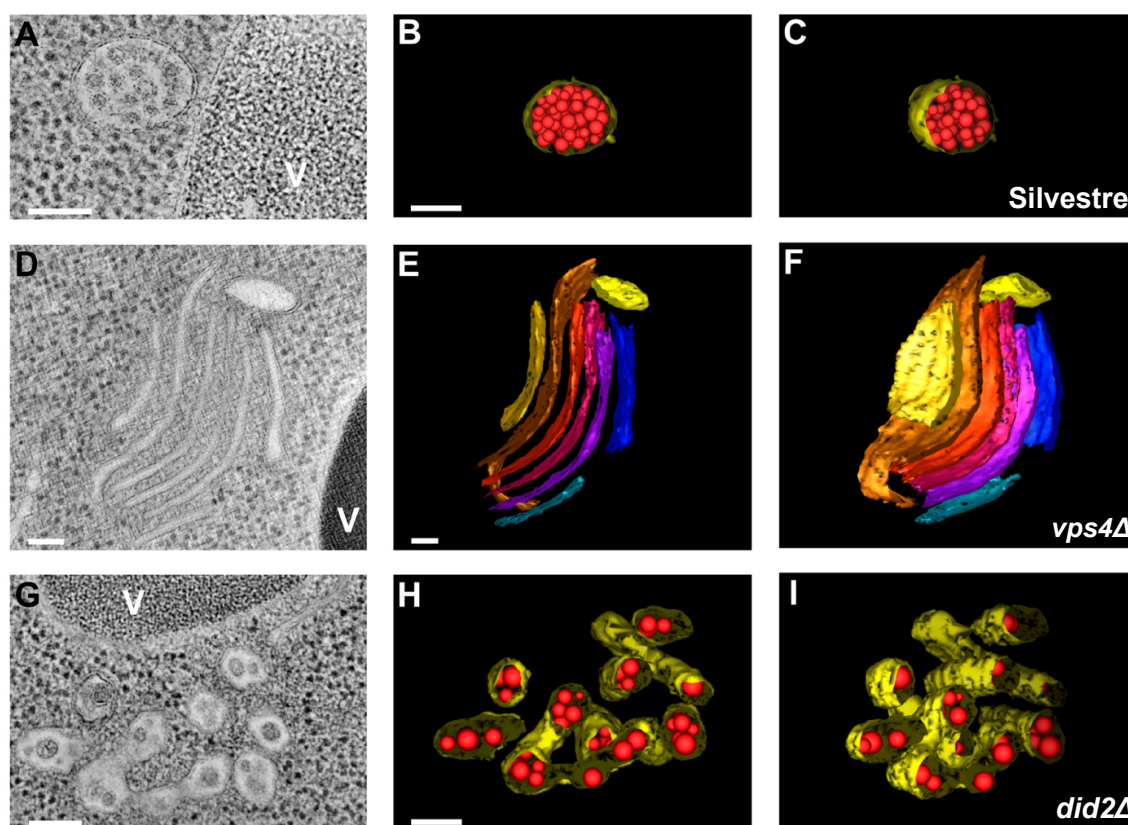


Figura I-7: Análisis por tomografía de la morfología de los MVBs en *S. cerevisiae*. Imágenes bidimensionales (A, D, G) y modelos tridimensionales obtenidos por tomografía. En los MVBs la membrana está coloreada de amarillo y las ILVs de rojo. En el compartimento de clase E las distintas cisternas están coloreadas. Imágenes A-C: MVBs silvestres; imágenes E-F: “compartimento de clase E”; imágenes G-I: “weak class E compartment”. V: vacuola. Los genotipos aparecen indicados a la izquierda de la figura. La barra representa 100 nm. Tomado de Nickerson et al. ⁴⁶

Vps4p se recluta a la membrana endosomal mediante la interacción de su dominio MIT (“Microtubule-interacting and trafficking”) N-terminal con la región C-terminal de ciertos componentes del ESCRT-III (Figura I.-5). De las seis proteínas denominadas como “ESCRT-III like proteins” (Vps2p, Vps20p, Vps24p, Vps32p, Vps60p y Did2p), únicamente Vps2p y Did2p se unen directamente al dominio MIT de Vps4p^{82,85} a través de un motivo C-terminal denominado MIM (MIT-interacting motif). En *S. cerevisiae* se han identificado varias proteínas accesorias del complejo ESCRT-III: Did2p, Vta1p, Vps60p e Ist1p. Did2p regula la unión de Vps4p a las membranas, posiblemente estabilizando su unión con los complejos ESCRT-III⁸⁴. Vta1p es un potente activador de la actividad ATPasa de Vps4p (su unión estimula la hidrólisis de ATP hasta 8 veces)^{84,91}. Vps60p estimula la actividad hidrolítica de Vps4p de forma dependiente de Vta1p e independiente del dominio MIT de Vps4p⁹¹. Ist1p interacciona con Did2p y parece regular el desensamblaje de Vps4p^{92,93}. Incluso en ausencia de Vps60p y Did2p, Vps4p puede asociarse a la membrana endosomal y liberar los componentes del ESCRT-III, posiblemente gracias a su interacción con Vps2p⁴⁶. La ausencia de las proteínas accesorias Did2p, Vps60p o Vta1p no bloquea totalmente la ruta de los MVBs y por tanto, aunque se producen endosomas anormales, no se producen “compartimentos de clase E”. Por este motivo, la delección de *DID2*, *VTAI* o *VPS60* causa lo que se puede denominar como un fenotipo de clase E atenuado (“weak class E phenotype”)⁹³. El compartimento generado en mutantes *did2Δ* de *S. cerevisiae* ha sido caracterizado al microscopio electrónico⁴⁶. En este caso los endosomas están deformados y forman estructuras tubulares, pero a diferencia del “compartimento de clase E”, generado por la delección de *VPS4*, presentan vesículas intraluminales, aunque de menor tamaño (Figura I.-7).

1.3.1.4.3 Deubiquitinación del cargo

Los cargos se deubiquitinan antes de su internalización en las ILVs. La deubiquitinación es necesaria para reciclar y mantener los niveles de ubiquitina libre en el citoplasma⁹⁴. De las 16 deubiquitininasas (DUB) existentes en *S. cerevisiae*, sólo la cisteín-proteasa Doa4 participa en la ruta de los MVBs^{38,40,95}. En *S. cerevisiae*, la correcta deubiquitinación del cargo requiere que la proteína Bro1p reclute, a través de su interacción con Vps32p, a Doa4 a los endosomas^{96,97}. Bro1p juega un papel dual en la deubiquitinación del cargo, ya que no sólo recluta a Doa4 a la membrana del endosoma sino que también actúa como cofactor de la deubiquitinasa^{98,99}. La proteína Bro1p se caracteriza por tener una región N-terminal que forma un dominio conservado, denominado dominio Bro1 (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.2.1). Este dominio es necesario y suficiente para unirse a Vps32p, pero no participa en la unión a la región N-terminal de Doa4p⁹⁹. Doa4p se activa por la interacción de el motivo Tyr-Pro-X-Leu, situado en su región catalítica, con una secuencia C-terminal rica en prolinas de Bro1p⁹⁹. Dicha interacción es análoga a las descritas por primera vez entre los motivos Tyr-Pro-X-Leu de PacC y la proteína PalA¹⁰⁰ (*vide infra*). En definitiva Bro1p coordina la función y especificidad de Doa4p.

1.3.2 OTRAS FUNCIONES DE LOS COMPLEJOS ESCRT

La mayor parte de los datos acerca de la función de los complejos ESCRTs provienen de estudios relacionados con receptores de membrana y su tráfico a través de los compartimentos endocíticos. No obstante, en metazoos, muchos de los componentes de los complejos ESCRT-III desempeñan funciones en procesos que no están relacionados con la biogénesis de los MVBs. Por ejemplo, el homólogo en humanos de Vps23, TSG101, participa en la regulación del ciclo celular estimulando la degradación de p53, lo que da lugar a la entrada en mitosis ¹⁰¹. En *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que la inactivación de TSG101 o de Vps25 afecta a la polaridad de las células epiteliales ¹⁰²⁻¹⁰⁴, lo que sugiere que estas Vps estarían implicadas, de alguna manera, en la organización del citoesqueleto ¹⁰³. De hecho, embriones en los que se depleciona Vps28 presentan alteraciones en el citoesqueleto de actina (revisado en Slagsvold et al. ¹⁰⁵). También, se ha propuesto que ALIX, homólogo en humanos de Bro1p, interacciona tanto con la actina como con los microtúbulos ^{106,107}. En células de mamífero, el complejo ESCRT-II fue inicialmente identificado como un complejo que regulaba la actividad de la polimerasa II ¹⁰⁸, y el homólogo en humanos de Did2p, CHMP1 (Chromatin Modifying Protein 1), fue caracterizado como una proteína implicada en la regulación de la estructura de la cromatina ¹⁰⁹. Algunos de los datos acerca de la participación de los complejos ESCRTs en funciones no relacionadas con los MVBs han de ser tomados con cierta reserva ya que, en mamíferos, existen distintas isoformas de una misma Vps. La existencia de estas isoformas podría reflejar la evolución de algunas de ellas para funciones específicas no relacionadas con la biogénesis de los MVBs. Aunque, hay que señalar que, con la excepción de Did2 de la cual existen dos isoformas en mamíferos (CHMP1A y B), del resto de proteínas mencionadas en los ejemplos anteriores no se conocen isoformas (Tabla I.-1).

En *S. cerevisiae* todos los componentes de los complejos ESCRT-I y ESCRT-II, así como Vps32p y Vps20p de ESCRT-III, son necesarios para la señalización por pH ambiental ¹¹⁰⁻¹¹⁴. La delección de cualquiera de los genes que codifican para estas proteínas previene la activación de Rim101p, el factor de transcripción que media la regulación de la expresión génica por pH ambiental. Dos de las proteínas que forman parte de la ruta de transducción de señal, Rim20p (parólogo de Bro1) y Rim13p interaccionan con Vps32p ¹¹⁵ en ensayos de doble híbrido.

En *A. nidulans*, los complejos ESCRT también participan en la ruta de señalización por pH. Nuestro laboratorio ha descrito la interacción de Vps32 con la proteína PalA (ortólogo de Rim20) ¹⁰⁰ y de Vps24 con PalB (ortólogo de Rim13) ¹¹⁶. Además, el procesamiento proteolítico que da lugar a la activación del factor de transcripción PacC, homólogo de Rim101p, se ve afectado en mutantes en los que se ha deleccionado el gen que codifica para la proteína asociada al ESCRT-III DidB (ortólogo de Did2p) ¹¹⁶.

1.4 LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE pH ALCALINO. FUNCIÓN DE LOS COMPLEJOS ESCRTs

El “cruce de caminos” entre la ruta de señalización por pH y la ruta de los MVBs abrió un nuevo campo de estudio acerca de la activación proteolítica de PacC y la caracterización de los genes en la transducción de señal de pH ambiental en *A. nidulans*, que ha sido una de las líneas de investigación principales de nuestro laboratorio.

1.4.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL pH AMBIENTAL EN *A. nidulans*

A. nidulans presenta una gran versatilidad metabólica y fisiológica que le permite sobrevivir en una gran variedad de condiciones ambientales. Por ejemplo, es capaz de crecer en un amplio rango de valores de pH ambiental (desde pH 2,5 hasta 10,5) ¹¹⁷. Esto es debido, por un lado, a un eficiente mecanismo homeostático que mantiene el pH intracelular relativamente constante ¹¹⁸ y, por otro lado, a un sistema regulador de la expresión génica que asegura que las distintas permeasas, enzimas extracelulares y metabolitos secretados se sintetizen sólo cuando el pH ambiental se acerca a su pH óptimo de actividad. De este modo, las fosfatasas extracelulares ácidas o alcalinas sólo se sintetizan cuando el pH extracelular es ácido o alcalino, respectivamente (revisado en Peñalva et al. ^{119,120}). La utilización de determinados compuestos como nutrientes también está regulada por el pH extracelular; tal es el caso del GABA (ácido γ -aminobutírico), que puede utilizarse como fuente de nitrógeno a pH ácido pero no a pH alcalino ^{121,122}.

El regulador clave de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio en *A. nidulans* es el factor de transcripción PacC. Sin embargo, *pacC* no es el único gen regulador que media respuestas a pH ambiental ^{123,124}. Se han identificado otros genes reguladores implicados en la respuesta génica al pH ambiental como *crzA*. *CRZ1*, el homólogo en *S. cerevisiae* de *crzA*, es responsable de la activación de los genes alcalinos dependientes de calcio. La alcalinización del medio provoca la entrada de calcio desde el exterior de la célula. El consiguiente incremento del calcio citosólico promueve la activación de la calcineurina, que a su vez desfosforila y activa a Crz1p, que se transloca al núcleo para ejercer su función transcripcional ¹²⁵. Al igual que Crz1p, CrzA es importado al núcleo en *A. nidulans* en presencia de calcio en el medio ¹²⁶. Otro gen implicado en la regulación génica en respuesta a pH en *A. nidulans* es *sltA*. La pérdida de función de *sltA* produce sensibilidad a diversos cationes como Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cs⁺ y Li⁺, hipersensibilidad a neomicina e incapacita al hongo para crecer en medio alcalino ¹²⁶.

En *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica* existen homólogos de PacC a los que se les denomina Rim101p, CaRim101p y YIRim101p, respectivamente (revisado en Peñalva et al. y Arst et al. ^{119,127}).

1.4.2 GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN POR pH AMBIENTAL

Los siete genes implicados directamente en la regulación por el pH ambiental en *A. nidulans* se identificaron mediante cribado génico^{118,128,129}. Estos genes son el gen *pacC* y seis genes denominados *pal*: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*¹³⁰⁻¹³⁷. Los datos genéticos formales demuestran que, a pH ambiental alcalino, pero no a pH ácido, los productos de los seis genes *pal* transducen una señal capaz de desencadenar la activación del factor de transcripción codificado por *pacC*, promoviendo la expresión de “genes alcalinos” y previniendo la expresión de “genes ácidos”^{119,120,127,129,138} (Figura I.-8).

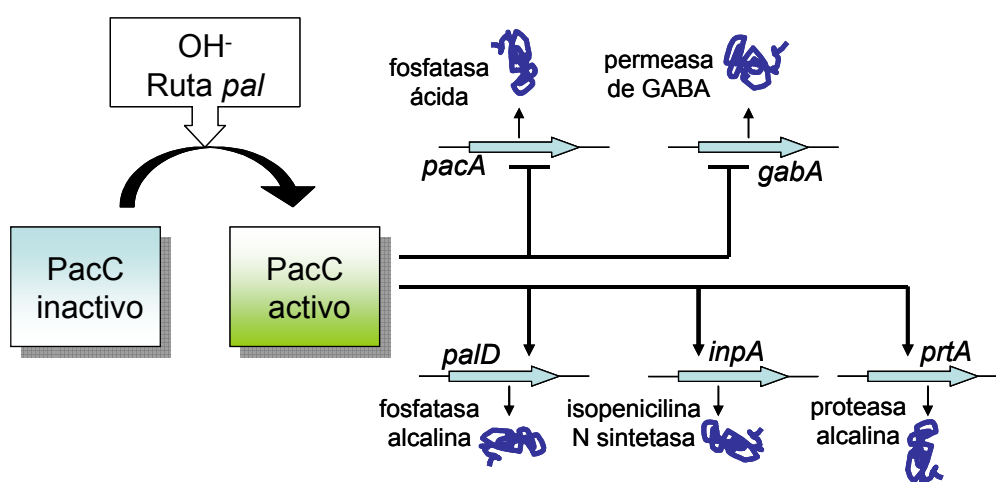


Figura I.-8: Modelo genético formal de la regulación por pH en *Aspergillus nidulans*. En respuesta a la señal de pH alcalino transducida por la ruta *pal*, PacC, hasta entonces inactivo, pasa a su forma activa. PacC activo es un represor de “genes ácidos”, tales como *pacA* y *gabA*, y un activador de “genes alcalinos” como *palD*, *ipnA* y *prtA*. Mutaciones de pérdida de función tanto en *pacC* (*pacC*^{-/-}, *pacC*^C), como en los genes *pal*, mimetizan los efectos del pH ambiental ácido y dan lugar a la desrepresión de “genes ácidos” y a la ausencia de expresión de los “genes alcalinos”. Las mutaciones *pacC*^C, sin embargo, dan lugar a la activación de PacC a cualquier pH ambiental de manera independiente de la ruta *pal*. Dichas mutaciones mimetizan los efectos de un ambiente alcalino. Tomado de Peñalva et al.¹¹⁶

1.4.2.1 Genética formal de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans*

Las mutaciones que han sido aisladas en el sistema de regulación por pH se pueden clasificar en tres categorías (Tabla I.-2):

1.- Mutaciones de mimesis de acidez. Independientemente del pH ambiental, dan lugar a un patrón de expresión génica similar al de una estirpe silvestre en condiciones ácidas. Es decir, estas mutaciones aumentan la transcripción de los genes que se expresan preferentemente en condiciones ácidas (“genes ácidos”) y disminuyen la de aquellos que lo hacen en condiciones alcalinas (“genes alcalinos”). Estas mutaciones son mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los siete genes indicados anteriormente (Tabla I.-2, filas 2-4) y fenotípicamente se caracterizan por impedir parcial, o totalmente, el crecimiento a pH alcalino, causar hipersensibilidad a molibdato e hiperresistencia a neomicina. Las mutaciones de mimesis de acidez también dan

lugar a un aumento de los niveles de fosfatasa ácida extracelular y a la reducción de los niveles de fosfatasa alcalina extracelular ^{118,129,139}. Las mutaciones de pérdida de función parcial (*pacC*^{+/−}) y total (*pacC*) en *pacC* pertenecen a este grupo y son generalmente recesivas (Tabla I.-2, filas 2 y 3) ^{118,127,129}. La mutación *pacCΔ* es, además, crioinsensible y da lugar a una acusada deficiencia en la conidiación ¹¹⁸ (Tabla I.-2, fila 2).

2.- Mutaciones de mimesis de alcalinidad. Independientemente del pH ambiental, dan lugar a un patrón de expresión génica similar al que presentaría una estirpe silvestre cultivada a pH alcalino. Estas mutaciones son mutaciones de ganancia de función en *pacC* (*pacC*^c), co-dominantes al alelo silvestre y epistáticas a las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal* ¹²⁹. A nivel transcripcional, las mutaciones *pacC*^c son constitutivas para la expresión de los “genes alcalinos” y dan lugar a la super-represión de los “genes ácidos” ^{129,140-144}. Este tipo de mutaciones, que no se han encontrado en ninguno de los genes *pal* resultan en un fenotipo especularmente opuesto a las mutaciones de mimesis de acidez (Tabla I.-2, fila 5).

3.- Mutaciones de mimesis de neutralidad. Independientemente del pH ambiental, el patrón de expresión génica resultante de estas mutaciones se aproxima al de una estirpe silvestre crecida a pH 6,5 y conlleva la expresión simultánea de “genes ácidos” y “genes alcalinos”. Estas mutaciones se denotan como *pacC*^{c/−} ^{119,145}, y presentan una mezcla heterogénea de las características fenotípicas de las mutaciones de mimesis de acidez y alcalinidad (Tabla I.-2, fila 6).

Fenotipo	Genotipo	Crecimiento a 25°C	Crecimiento a pH8	Crecimiento en medio con:			Tinción Fosfatasa:		
				Molibdato 6mg/ml	Neomicina 1mg/ml	GABA como fuente de N.*	Ácida	Alcalina	
Silvestre	<i>pacC</i> ⁺	+++	+++	+	+	−	+	+	1
Mimesis de Acidez	<i>ΔpacC, pacC</i> [−]	−	−	−	+++	++	+++	−	2
	<i>pal</i> [−] , <i>pacC</i> ^{+/−}	+++	−	−	+++	++	+++	−	3
	<i>pall</i> [−]	+++	+	−	+++	++	++	−	4
Mimesis de Alcalinidad	<i>pacC</i> ^c	+++	+++	++	−	−	−	++	5
Mimesis de Neutralidad	<i>pacC</i> ^{c/−}	+++	++	++	++	+	++	+	6

Tabla. I.-2: Características fenotípicas asociadas a las mutaciones en los genes *pal* y en el gen *pacC*. Los fenotipos corresponden al crecimiento en medio sintético completo (MMA suplementado con glucosa al 1%, tartato de amonio 5 mM y los requerimientos adecuados) tamponado a pH 6,5. Las placas se incubaron a 37°C. El medio en el que se realizó la tinción de fosfatasa (tanto ácida como alcalina) era bajo en fosfato (100 μM). (*) En este caso se usó 10 mM GABA como única fuente de nitrógeno en cepas *areA*[−]. La clasificación del crecimiento oscila entre ausencia total de crecimiento (−) y crecimiento vigoroso (+++), donde la tasa de crecimiento aumenta o disminuye según lo hacen los signos + ¹¹⁶.

Dentro de estas tres clases de mutaciones en *pacC* existe una considerable variabilidad fenotípica. En contraste con las distintas clases fenotípicas de mutaciones obtenidas en *pacC* ^{118,129,143,145,146}, en *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *pall* sólo se han obtenido mutaciones de mimesis de acidez ^{128,129,146}. Los alelos nulos de los genes *pal* son indistinguibles fenotípicamente entre sí, a excepción de *pall*, donde causan un fenotipo similar al de

mutaciones de pérdida de función parcial en los otros genes *pal*^{128,129,132,134,146} (Tabla I.-2, comparar filas 3 y 4). Las mutaciones en los seis genes *pal* son, en todos los casos, recesivas e hipostáticas a la gran mayoría de mutaciones en *pacC*^{119,120,127,128,139}. En conjunto, los datos genéticos y fenotípicos indican que *pacC* actúa corriente abajo de los seis genes *pal*, los cuales deben participar en un proceso común.

1.4.3 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PacC

PacC es un factor de transcripción que contiene un dominio de unión a DNA formado por tres dedos de zinc tipo Cys₂-His₂, que reconocen la secuencia consenso 5'-GCCARG (donde R es una purina)^{129,147}. La presencia de tres de estos motivos en el promotor de *ipnA* (gen que codifica para la isopenicilin N-sintetasa¹⁴⁰) es necesaria y suficiente para que PacC active la expresión de este gen en respuesta a un pH ambiental alcalino¹⁴¹. En el caso de *gabA*, que codifica para el transportador de GABA, PacC ejerce su función represora compitiendo, a nivel de unión a DNA, con IntA/AmdR (el activador transcripcional específico de *gabA*)¹⁴³. Estos trabajos demostraron que PacC es un factor de transcripción capaz de activar directamente la expresión de un gen estructural “alcalino”(*ipnA*) y reprimir la de un gen “ácido”(*gabA*) (Figura I.-8).

1.4.3.1 Activación de PacC

PacC puede detectarse en tres especies moleculares, denominadas en función de su masa molecular: PacC⁷² (72 kDa), PacC⁵³ (53 kDa) y PacC²⁷ (27kDa)^{145,146,148,149}. PacC⁵³ y PacC²⁷ se originan por el procesamiento proteolítico en dos pasos del producto primario de traducción PacC⁷² (72 kDa) que contiene 674 aminoácidos^{129,145}. PacC⁷² presenta tres regiones de interacción intramoleculares, denominadas A, B y C, que mantienen a la proteína en una conformación “cerrada”, que previene su procesamiento proteolítico (Figura I.- 9). A pH ambiental neutro o alcalino PacC⁷² se procesa a PacC⁵³ (53 kDa)¹⁴⁶. Este primer suceso proteolítico es dependiente tanto del pH ambiental como de la integridad de la ruta *pal*, por lo que se le denomina “corte señalizador”. La “proteasa señalizadora” (presumiblemente PalB) elimina alrededor de 180 residuos C-terminales de PacC⁷². El corte de la “proteasa señalizadora” se produce en una región conservada de 24 residuos, que se ha denominado “signalling protease box”, cuya delección previene el procesamiento de PacC⁷² a PacC⁵³^{146,150}. Al eliminar la región de interacción intramolecular C, el corte señalizador suprime las interacciones intramoleculares que mantienen a PacC⁷² en la conformación cerrada de manera que el producto PacC⁵³ es accesible a la “proteasa procesativa” y es procesado a PacC²⁷ (27 kDa). La evidencia genética y bioquímica indica que esta proteasa procesativa es el proteasoma¹⁴⁹. PacC²⁷, la forma completamente procesada de PacC, está constituida por los ~ 250 aminoácidos N-terminales del factor de transcripción, que incluyen los dedos de zinc. PacC²⁷ presenta un extremo C-terminal heterogéneo y se detectan hasta cuatro formas diferentes de tamaño muy similar en los análisis de movilidad electroforética¹⁴⁹.

1.4.3.2 Localización subcelular de PacC

El procesamiento proteolítico en dos pasos de PacC promueve su importe nuclear, de modo que tanto PacC⁵³ como PacC²⁷ se localizan preferentemente en el núcleo ¹⁵¹⁻¹⁵³. Como factor de transcripción que es, PacC debe acceder al interior nuclear para poder desempeñar su función. En ausencia de señal de pH alcalino el procesamiento de PacC está bloqueado y PacC⁷² se localiza principalmente en el citoplasma, aunque existe cierta proporción que se encuentra en el núcleo. En respuesta a la alcalinización del medio, y como consecuencia de la activación de la ruta de transducción de la señal de pH, la localización de PacC cambia, de manera que la forma procesada PacC²⁷ se localiza exclusivamente en el núcleo ¹⁵¹. PacC contiene al menos dos señales de localización nuclear (NLS) independientes entre sí, que se denominan NLS1 y NLS2 ^{149,151,152,154} (Figura I-9). La NLS1 es una NLS monopartita clásica, situada en la α -hélice del tercer dedo de zinc de PacC. Se ha demostrado que esta señal media la importación nuclear activa de PacC²⁷ y PacC⁷² ^{151,154}. La NLS2 de PacC, situada entre los aminoácidos 250 y 273, es una señal de localización nuclear bipartita clásica, oculta en la conformación cerrada de PacC. El procesamiento de PacC⁷² a PacC⁵³ expone a la NLS2, lo que permite que el heterodímero KapA/KapB (importina- α/β) interactúe con ella, promoviendo el transporte de PacC⁵³ al núcleo (en cooperación con la NLS1) ^{152,153}.

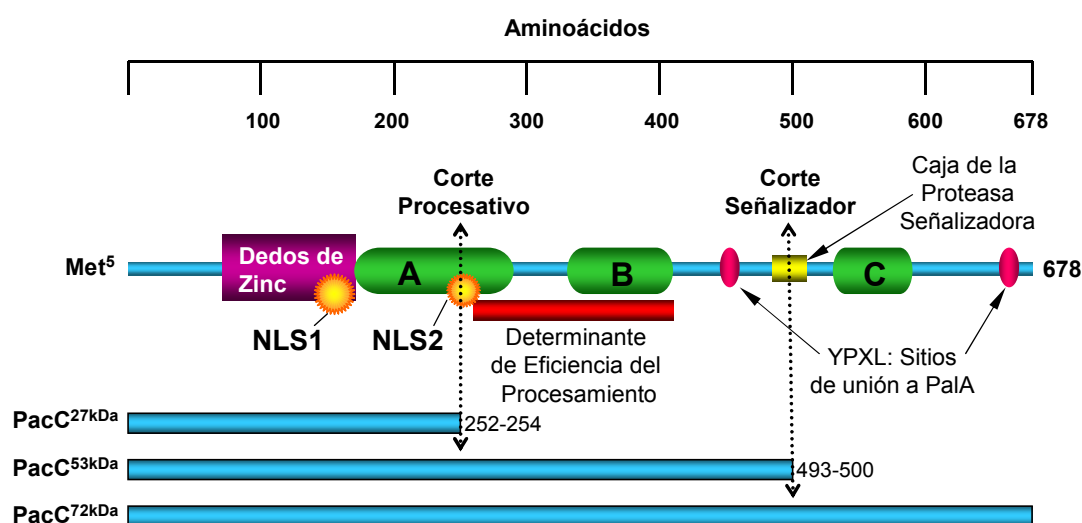


Figura I-9: Esquema del factor de transcripción PacC. Se muestran las características más importantes de PacC. A, B y C son las regiones interactoras que mantienen a PacC⁷² en una conformación cerrada en ausencia de señal de pH ¹⁴⁰. La unión de PalA a los sitios YPXL que flanquean la caja de la proteasa señalizadora de 24 residuos (residuos 479-502) es imprescindible para que el corte señalizador se produzca. La posición aproximada del punto de corte de la proteasa señalizadora es en alguno de los residuos entre el 493 y el 500 ^{116,143}. Una característica notable de PacC es la presencia de los dedos de zinc, donde el dedo 1 interacciona con el dedo 2, y los dedos 2 y 3 interaccionan con el DNA. En el dedo 3 se sitúa la NLS1 (NLS clásica) y en la región A la NLS2 (NLS bipartita). La proteasa procesativa requiere la presencia del determinante de eficiencia del procesamiento, y el punto de corte de esta proteína se sitúa entre los residuos 252 y 254 ^{143,146}.

1.4.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS CONTROLADOS POR LA REGULACIÓN POR pH AMBIENTAL DEPENDIENTE DE PacC/Rim101

Se han identificado distintos genes estructurales regulados por PacC, principalmente genes que codifican para enzimas extracelulares, permeasas y enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos que van a ser secretados. En *A. nidulans*, los genes estructurales requeridos para la síntesis de penicilina (*acvA*, *ipnA* y *acyA*) están regulados por PacC^{119,140,155}. Esto supone que tanto las condiciones alcalinas como las mutaciones *pacC*^c incrementan la producción de penicilina¹⁴⁰. Del mismo modo, mutaciones en el gen *pacC* de *Penicillium chrysogenum*, equivalentes a las mutaciones de mimesis de alcalinidad *pacC*^c, resultan en una superproducción de penicilina¹¹⁹. La regulación por pH ambiental juega un importante papel en la producción de otros antibióticos β -lactámicos como en el caso de la cefalosporina en *Acremonium chrysogenum*^{119,156}. El gen *afp*, que codifica para una proteína antifúngica secretada por *Aspergillus giganteus*, también está regulado transcripcionalmente por el pH ambiental¹⁵⁷. En *A. nidulans* las mutaciones *pacC*^c reducen drásticamente la producción de esterigmatocistina, un precursor de aflatoxinas y un tóxico en sí mismo, cuya producción es elevada a pH ácido^{119,158}.

1.4.4.1 La ruta RIM en *S. cerevisiae*

Rim101p, de 628 aminoácidos, es el ortólogo de PacC en *S. cerevisiae*. *RIM101* fue inicialmente descrito como un regulador positivo de la meiosis y posteriormente se identificó su papel en la respuesta de pH ambiental. Rim101p se activa por la ruta de daño de pared y, además, en respuesta a la alcalinización del medio^{159,160} mediante un único corte proteolítico, de manera dependiente de la ruta de transducción de la señal RIM. Este corte proteolítico corresponde al procesamiento de PacC⁷² a PacC⁵³ por la “proteasa señalizadora”. Cada uno de los componentes de la ruta RIM tienen su homólogo en la ruta *pal*: *RIM20* (*palA*), *RIM13* (*palB*)^{161,162}, *RIM8* (*palF*)¹⁶¹, *RIM21*⁸⁹ y *DFG16* (*palH*)¹⁶³, *RIM9* (*palI*)¹⁶¹ e *YGR122W* (*palC*) (este trabajo)¹³⁷. Una diferencia fundamental entre los mecanismos de acción de Rim101p y PacC es que, mientras que PacC actúa directamente como un activador transcripcional de los promotores de los “genes alcalinos” y represor de los “genes ácidos”, Rim101p parece actuar únicamente como represor. Rim101p reprime la expresión de represores transcripcionales como *NGR1* o *SMPI*, y controla indirectamente la expresión de los “genes alcalinos”^{124,160,164}.

El aumento de la expresión de *ENAI*, que codifica para una ATPasa de membrana plasmática que exporta iones Na⁺, es uno de los mecanismos que tiene *S. cerevisiae* como respuesta al pH alcalino o a concentraciones elevadas de Li⁺ y de Na⁺. *ENAI* está regulada por distintas rutas de señalización, incluyendo la represión de *NRG1*, por Rim101p (revisado en Ruiz et al.¹⁶⁵). Rim 101p regula positivamente, mediante la represión de *NGR1*, otros genes implicados en el transporte de iones, como el transportador de Fe⁺², *FET4*, o el gen *VMA4*, que codifica para una de las subunidades de la ATPasa vacuolar de H⁺ y que se requiere para el crecimiento a pH alcalino¹⁶⁶. La represión de *SMPI* por Rim101p está relacionada con el control de la integridad de la pared celular. Sm1p es probablemente un represor de *CWPI*, que codifica para una de las manoproteínas

que forma parte de la pared celular ¹²⁴.

1.4.4.2 La ruta RIM en *Candida albicans*

Para *Candida albicans*, un microorganismo que forma parte de la microbiota de las mucosas en humanos y es un patógeno oportunista, la capacidad de responder a cambios extremos de pH es esencial para colonizar distintos tejidos del huésped. *C. albicans* puede crecer *in vitro* a valores de pH entre 2 y 10. La ruta *CaRIM*, equivalente a la ruta *pal* en *C. albicans*, controla el dimorfismo, de manera que mientras el pH ambiental ácido favorece el crecimiento levaduriforme el pH ambiental alcalino favorece el crecimiento filamentoso (revisado en Davis et al. ¹⁶⁷). CaRim101p se necesita también para el crecimiento a pH alcalino o a concentraciones elevadas de Li⁺ ^{123,167,168}. CaRim101p se activa mediante un procesamiento proteolítico que elimina una región C-terminal, lo que da lugar a una forma de ~ 74 kDa en condiciones alcalinas y de ~ 65 kDa en condiciones ácidas ¹⁶⁸. CaRim101p parece actuar como un activador transcripcional del gen “alcalino” *PHR1* y como un represor transcripcional del “gen ácido” *PHR2*, mediante su unión a los promotores de estos genes ^{169,170}. CaRim101p también regula positivamente la expresión de la proteasa Sap5, que degrada la glicoproteína E-cadherina ¹⁷¹ y facilita la invasión de los tejidos.

PHR1 y *PHR2* son necesarios para que *C.albicans* infecte en ambientes alcalinos y ácidos respectivamente ¹⁷². Se ha demostrado, en ensayos *in vitro* con células endoteliales, que *C. albicans* se adhiere e invade a las células secretando enzimas líticas en su interior ¹⁷³. La disrupción de genes implicados tanto en la invasión celular como en el crecimiento filamentoso da lugar a cepas menos virulentas como ocurre en el caso de los mutantes *phr1*^{-/-} ¹⁷³.

1.4.4.3 La regulación de pH y la patogenicidad

La regulación por pH es un determinante crítico en la patogenicidad fúngica. La respuesta al pH ambiental se relaciona con la virulencia en plantas, insectos y animales (revisado en Peñalva et al. ^{119,138}). En modelos murinos de aspergilosis pulmonar, inóculos de cepas de *A. nidulans* con mutantes de pérdida de función mostraron virulencia reducida, mientras que la activación constitutiva de PacC causó un incremento en la mortalidad (que se correlaciona con un aumento de la invasividad del hongo) ¹⁷⁴. *A. fumigatus* es el más común de los mohos patógenos al hombre y uno de los más devastadores. Su captación de hierro, un factor limitante durante la infección, se realiza mediante sideróforos cuya expresión génica está regulada por PacC y es esencial para la virulencia ¹⁷⁵.

No obstante, la activación de Rim101/PacC no siempre deviene en un aumento de la virulencia, lo que pone de manifiesto los distintos mecanismos implicados en la patogenicidad fúngica. Mientras que mutantes *pacC*^{+/-} de *A. nidulans*, *C. albicans* y *Sclerotinia sclerotiorum* son menos virulentas que las estirpes silvestres ^{172,176,177}, los mutantes *pacC*^{+/-} de *Fusarium oxysporum* son más virulentos que las estirpes silvestre cuando infectan la raíces de la planta del tomate ^{178,179}.

1.4.5 MODELO DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE pH EN *Aspergillus nidulans*, LA RUTA *pal*

Los trabajos realizados en *A. nidulans* y en *S. cerevisiae* han demostrado que los componentes de la ruta de señalización por pH ambiental están conservados y que, aparentemente, se organizan en dos complejos proteicos distintos. En el modelo vigente para la ruta de señal de pH en *A. nidulans*, PalH, PalI y PalF forman parte del complejo situado en la membrana plasmática, al que se denomina “complejo superior”^{136,180}, en contraposición al “complejo inferior” situado hipotéticamente en la membrana del endosoma, y que está formado al menos por las proteínas PalA, PalB y PacC⁷² que interactúan con proteínas del ESCRT-III^{100,110,111,116,116,180-182}.

1.4.5.1 El complejo de señalización por pH ambiental de la membrana plasmática

El complejo superior de membrana plasmática está formado por la proteína de 7 dominios transmembrana (TMD) PalH, la β -arrestina PalF y la proteína de 3-TMD PalI^{136,180} (Figura I.-10).

La cola C-terminal de PalH interactúa fuertemente con la β -arrestina PalF, y mutaciones en PalF o PalH que previenen esta interacción impiden la señalización por pH¹⁸⁰. PalF se fosforila y poli-mono-ubiquitina de manera dependiente del pH ambiental alcalino y de PalH, y de manera parcialmente dependiente de PalI¹⁸⁰. Dado que las arrestinas actúan regulando la función de los receptores 7-TMD de membrana plasmática^{183,184}, PalH sería el receptor de la ruta de pH.

PalI se localiza en membrana plasmática. Los mutantes nulos de *palI* tienen un fenotipo similar al de pérdida de función parcial en otros genes *pal*, lo que indica que PalI tiene un papel importante, pero no esencial, en la ruta de pH. Una posible función de PalI sería la de asegurar la localización de PalH en la membrana plasmática. Cuando se sobreexpresa PalH::GFP, éste se localiza en membrana plasmática pero predomina en estructuras citosólicas que podrían corresponderse con endosomas. La cosobreexpresión de PalI relocaliza a PalH::GFP en la membrana plasmática¹³⁶. El posible papel de PalI en la localización de PalH en la membrana plasmática concuerda con el hecho de que la sobreexpresión de PalH revierte parcialmente el fenotipo de pérdida de función de los mutantes *palI*¹³⁶. Esto demuestra que, en mutantes *palI*, la expresión de PalH a niveles fisiológicos es insuficiente para permitir el crecimiento normal a pH alcalino, posiblemente porque no haya suficientes moléculas de PalH en la membrana plasmática.

1.4.5.2 El complejo de señalización por pH ambiental asociado a la membrana del endosoma

El modelo de la regulación de la expresión génica por pH alcalino incluye a un segundo complejo proteico asociado, a través del ESCRT-III, a la membrana del endosoma. Este complejo incluye a PalA, PalB y,

al menos de forma transitoria, a PacC⁷² (revisado en Peñalva et al. ^{120,138}).

El gen *palA* codifica para una proteína de 848 residuos, cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* es RIM20 ^{110,139}. PalA y Rim20p interaccionan con Vps32 ^{100,110}. La transducción de la señal de pH, y el consiguiente procesamiento proteolítico tanto de PacC⁷² como de su homólogo en levaduras Rim101p, requiere que PalA y Rim20p se unan a sus respectivos factores de transcripción a través de dos motivos tetrapeptídicos Tyr-Pro-X-Leu/Ile que, en el caso de PacC⁷², flanquean la caja de la proteasa señalizadora (“signalling protease box”) ^{100,110} (Figuras I.-9 E I.-10). PalA y Rim20p, al igual que la proteína de mamíferos AIP1/ALIX, pertenecen a la familia de proteínas con dominio Bro1, generalmente implicadas en rutas de transducción de señal y tráfico de membranas ^{98,185-188}. Tanto Alix como Bro1p y PalA/Rim20p interaccionan con Vps32 ^{100,111,189,190}. Sin embargo, Bro1p y PalA/Rim20p tienen funciones distintas: mientras que Bro1p es una proteína de clase E y está implicada en el “MVB pathway” ^{98,185,186,191,192}, PalA y Rim20p juegan un papel fundamental en la transducción de la señal de pH alcalino, pero no participan en la ruta de los MVBs ^{100,110,181}.

PalB/Rim13p es una cisteín-proteasa con un dominio catalítico característico de las calpaínas (cisteín proteasas dependientes de Ca²⁺) ¹³⁰. A pesar de conservar la tríada catalítica característica de dichas proteasas (Cys-His-Asn), PalB/Rim13p es una calpaina atípica, ya que carece de los dominios de unión a Ca²⁺ (calmodulin-like calcium binding domain IV) característicos de las calpaínas ^{193,194}. Junto al dominio catalítico de PalB/Rim13p se encuentra una región altamente conservada denominada dominio PBH (“*PalB Homology Domain*”), presente también en otras proteínas homólogas de PalB, como la calpaina 7 (en humanos y ratón) o Tra-3 (en *C. elegans*) ^{194,195}. La diferencia fundamental entre PalB y Rim13p es la presencia, en la región N-terminal de PalB, del dominio MIT (Microtubule Interacting and Trafficking domain). PalB interacciona a través de dicho dominio con el motivo C-terminal de Vps24, MIM (MIT Interactor Motif) ^{116,182}. PalB se requiere para el corte señalizador pero no para el procesativo ¹⁵⁰, por lo que PalB es el principal candidato a ser la proteasa señalizadora de PacC.

Por tanto, se postula que existen dos complejos separados implicados en la señalización por pH alcalino, con PalH, PalI y PalF formando parte del “complejo superior”, y PalA y PalB formando parte del “complejo inferior”. Sin embargo, al comenzar este trabajo se desconocía el papel de PalC, el sexto gen de la ruta. PalC es una proteína de 507 residuos que se caracteriza por tener en su extremo C-terminal dos residuos aromáticos, que están conservados en otros hongos *euscomycetes* y *basidiomycetes*, y una región N-terminal con una relativa similitud con el dominio Bro1 ¹³⁵ lo que, *a priori*, situaría a PalC como un componente del “complejo inferior”. Asimismo, no se había detectado la presencia de un homólogo de PalC en *hemiascomycetes*.

1.4.5.3 Modelo de señalización por pH ambiental

La β -arrestina PalF se fosforila y poli-mono-ubiquitina de manera dependiente de PalH, parcialmente de PalI pero de manera independiente de PalA, PalB y PalC ¹⁸⁰. Esto indica que la fosforilación/ubiquitinación de PalF es uno de los primeros pasos en la transducción de la señal de pH. El hecho de que PalH y PalI se localicen

en la membrana plasmática, mientras que PalA y PalB interactúan con proteínas asociadas a la membrana del endosoma, donde presumiblemente se produce el corte señalizador de PacC⁷², plantea la cuestión de cómo, tras la alcalinización del medio, se comunican e interrelacionan ambos complejos para transmitir la señal de pH y mediar la activación proteolítica de PacC⁷².

Según el modelo descrito anteriormente, el producto primario de traducción de *pacC*, PacC⁷², se encuentra en una conformación “cerrada” debido a las interacciones intramoleculares entre las regiones A, B y C. La alcalinización del medio activa la ruta *pal* que transduce la señal de pH alcalino, la cual promueve el corte señalizador que elimina la región interactiva C-terminal de PacC⁷², que se convierte en PacC⁵³ que es accesible a la proteasa procesativa (Figura I.-10).

Cuando el pH ambiental es alcalino se produce la activación del complejo de membrana plasmática, donde el receptor 7-TMDs PalH actúa, casi con certeza, como sensor de pH, mientras que PalI tiene un papel accesorio al promover la localización de PalH en la membrana plasmática¹³⁶. La β -arrestina PalF interactúa fuertemente con la región citosólica de PalH¹⁸⁰, se fosforila y ubiquitina en respuesta a la alcalinización del medio, de manera dependiente del receptor PalH y, en menor medida, de PalI¹⁸⁰. El papel clásico de las arrestinas en la transducción de señal es prevenir la interacción de las proteínas G heterotriméricas con sus receptores de 7-TMDs, y promover la endocitosis y subiguiente silenciamiento degradativo de estos últimos. No obstante, las β -arrestinas pueden tener un papel positivo en la señalización celular, tanto a través de la endocitosis de los receptores de 7-TMDs, como mediante la nucleación de complejos de señalización, sin la intervención de proteínas G heterotriméricas^{183,196,197}. Esto concuerda con el papel positivo de la β -arrestina PalF en la ruta de transducción de la señal de pH. Por tanto, La ubiquitinación de PalF podría promover la internalización del complejo PalF-PalH y transmitir, de esta manera, la señal de pH ambiental alcalino a la maquinaria de procesamiento que actúa en el complejo “inferior”^{138,180}.

PalA y PalB, componentes del complejo “inferior”, interactúan con ESCRT-III. PalA recluta a PacC⁷² a dicho complejo gracias a su capacidad de unirse a los motivos Tyr-Pro-X-Leu de PacC¹⁰⁰. En dicho escenario es donde debe actuar la proteasa señalizadora, probablemente PalB, que corta a PacC en la caja de la proteasa señalizadora (“signalling protease box”) para dar lugar a PacC⁵³. La localización de PalB en la membrana del endosoma estaría mediada en parte por su interacción con Vps24. PacC⁵³ posiblemente se suelta del complejo asociado a ESCRT-III al eliminarse uno de los sitios de unión a PalA¹⁸⁰, y es así sustrato, puesto que se encuentra en una conformación accesible, del proteasoma¹⁴⁹ que lo procesa a PacC²⁷. PacC²⁷ se localiza exclusivamente en el núcleo¹⁵⁴ donde lleva a cabo su función: activar la expresión de los “genes alcalinos” y reprimir la de los “genes ácidos” (Figura I.-10). El hecho de que PalC contenga en su región N-terminal un dominio Bro1-like¹³⁵ indica que su función estaría relacionada con el complejo inferior.

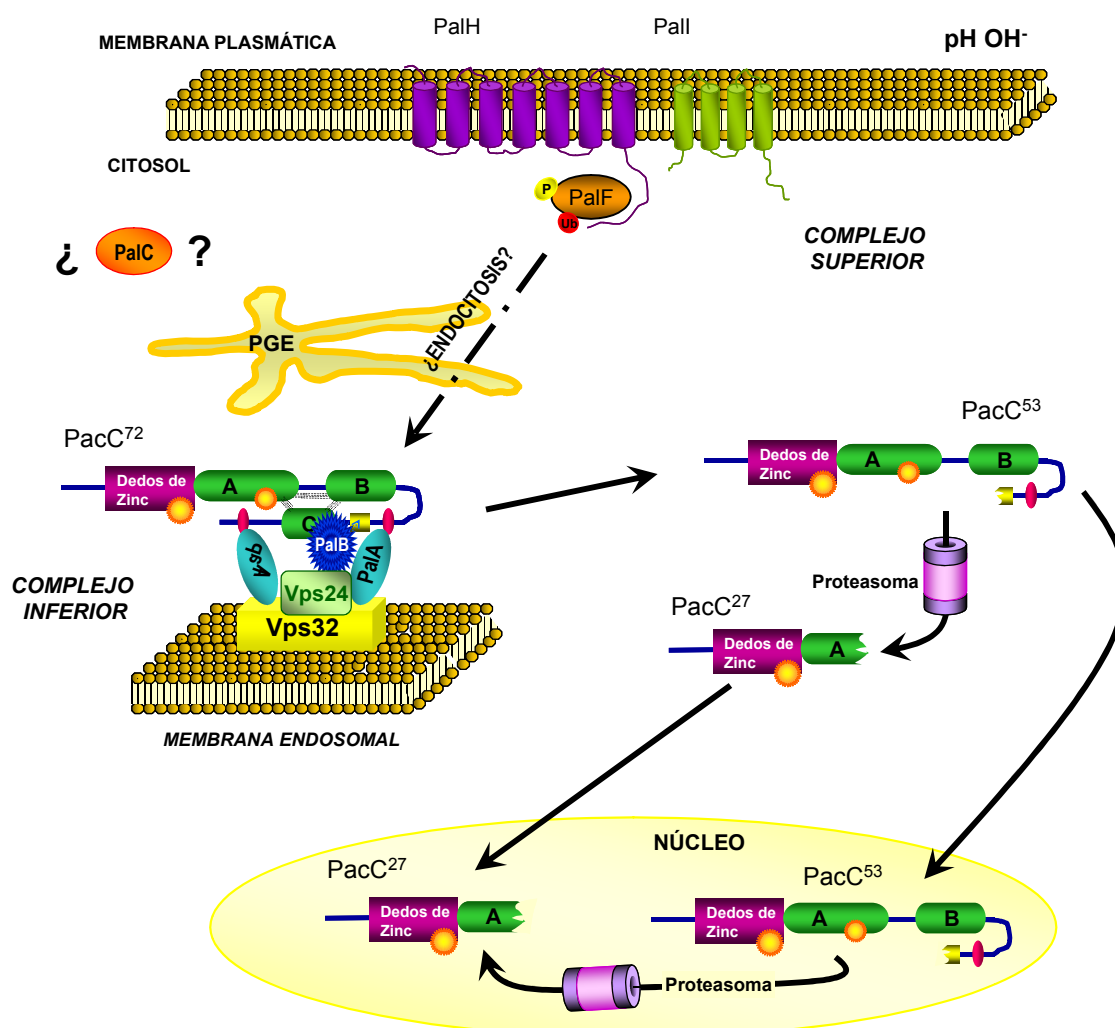


Figura I.-10: Modelo molecular de la respuesta a pH alcalino en *Aspergillus nidulans*. El “complejo superior”, asociado a la membrana plasmática, está integrado por PalH, Pall y PalF. PalF se fosforila (P) y ubiquitina (Ub), en respuesta a la alcalinización del medio, de manera dependiente de PalH y parcialmente dependiente de Pall. La señal se transmite al “complejo inferior”, situado, según el modelo vigente¹³⁵ en la membrana del endosoma, por la endocitosis del complejo PalF/PalH. PalA y PalB, forman parte del complejo asociado al ESCRT-III de la membrana del endosoma: PalA interacciona con Vps32 y PalB interacciona con Vps24. PacC⁷² se recluta a este hipotético complejo situado en la membrana del endosoma a través de su interacción con PalA. La proteasa señalizadora, probablemente PalB, corta a PacC⁷² en la caja señalizadora (eliminando su extremo C-terminal inhibitorio) y da lugar a PacC⁵³. PacC⁵³ es procesada por el proteasoma que provoca la degradación en la región 252-254 para dar lugar a PacC²⁷. PacC⁷² tiene localización citoplásmica y nuclear, mientras que PacC⁵³ y PacC²⁷ se localizan exclusivamente en el núcleo. Al comienzo de esta tesis no se tenían datos que permitiesen asociar a PalC con alguno de los dos complejos.

En este modelo se requiere explicar la conexión que relacione de manera específica el complejo superior con el complejo inferior. El tráfico de la membrana plasmática a los endosomas del complejo PalH-PalF, mediado por la activación de PalF (fosforilación y ubiquitinación), podría explicar cómo se transmite la señal entre uno y otro complejo. No obstante, aunque en *S. cerevisiae* Rim20p se localiza en endosomas, en *A. nidulans*

no se puede descartar que, al igual que sucede con el proceso de gemación de los retrovirus (véase Introducción, apartado 1.5), la activación del complejo PalF/PalH reclute al complejo ESCRT-III a membrana plasmática, y que sea en la membrana plasmática donde se ensamble el complejo formado por ESCRT-III, PalA, PalB y PacC⁷².

1.4.6 La doble función del complejo ESCRT-III

Mitchell definió la participación de los complejos ESCRT en el procesamiento de PacC/Rim101 como un paradigma de la transducción de señal asociada a vesículas (VAST, vesicle-associated signal transduction)¹⁹⁸.

En *S. cerevisiae*, donde se identificó la participación del “MBV pathway” en la transducción de señal de pH, el procesamiento de Rim101p es dependiente de todos los componentes de los complejos ESCRT-I y ESCRT-II y de las proteínas Vps20p, y Vps32p del complejo ESCRT-III^{111,114}. Además, estirpes en las que se ha delecionado *VPS32* tienen un perfil de expresión similar a estirpes *rim101Δ*¹⁶³. Por el contrario, la delección de *VPS2*, *VPS24* o *VPS4* activa la ruta de pH de forma parcialmente constitutiva¹¹⁴. Si, según el modelo vigente, el reclutamiento de los complejos ESCRTs a la membrana del endosoma se produce de manera secuencial y cada complejo que se forma recluta al siguiente, el subcomplejo Vps20/Vps32 se asocia a la membrana endosomal de manera independiente de las subunidades Vps2p y Vps24³⁹. Estos datos apoyan la existencia de dos subcomplejos cimentados sobre el mismo “núcleo” Vps20p/Vps32p de ESCRT-III: uno implicado en la ruta de los MVBs (junto con Vps2p, Vps24p y Bro1p), y otro dedicado a la señalización por pH (junto con Rim20p y Rim13p)¹⁸¹. De manera que, posiblemente, la activación parcialmente constitutiva en las estirpes *VPS2Δ* y *VPS24Δ* se debería a que Rim13p y Rim20p no competirían con Vps2p y Vps24p para unirse al subcomplejo Vps32p/Vps20p¹¹⁴. En el caso de las estirpes *VPS4Δ*, no se produce el desensamblaje de los complejos ESCRT-III, por lo que el subcomplejo Vps20/Vps32 está siempre anclado a la membrana de los endosomas y accesible a Rim20p y Rim13p, pero la activación parcialmente constitutiva de la ruta de pH sería, en las estirpes *VPS4Δ*, menor que en el caso *VPS2Δ* y *VPS24Δ*, dado que Vps2 y Vps24 competirían con las proteínas Rim.

En *A. nidulans* el análisis de la función del complejo ESCRT-III en el procesamiento de PacC se ve complicado por el hecho de que los genes *vps* que codifican para las proteínas de los complejos ESCRTs son esenciales (Calcagno et al., resultados sin publicar). En cambio, la delección de *didB*, homólogo de *DID2*, es viable^{116,182}. En estirpes *didBΔ*, el corte señalizador de PacC se produce más eficientemente que en una cepa silvestre. Dado que la eficiencia del corte procesativo no aumenta, se acumula PacC^{53 116,182}. Puesto que la función de DidB es reclutar a Vps4, la delección de *didB* disminuye la eficiencia del desensamblaje del complejo ESCRT-III de las membranas⁴⁶. Por tanto, al aumentar la disponibilidad de ESCRT-III, la delección de *didB* facilitaría el ensamblaje del “complejo inferior”, lo que permitiría que el corte señalizador fuese más eficiente. Este resultado, junto con la interacción entre PalA y Vps32, señala que, al igual que en *S. cerevisiae*, el ESCRT-III juega un papel en el procesamiento de PacC. Durante el desarrollo de esta tesis se obtuvieron las primeras pruebas de que, en efecto, la interacción entre las proteínas de la ruta *pal* y las del ESCRT-III tienen un papel fisiológico en el procesamiento de PacC.

PalB se une a Vps24 y el procesamiento de PacC es ineficiente en estirpes mutantes que expresan PalB sin el dominio MIT^{116,182}, la región que media la unión a Vps24. Por tanto, al contrario de lo que sucede en *S.cerevisiae*, en *A.nidulans* Vps24 está directamente involucrado en la transducción de señal. La capacidad de unión de Vps24 a la membrana del endosoma podría estar relacionada con la correcta localización de PalB en la membrana endosomal o plasmática donde tendría lugar el procesamiento de PacC⁷². No obstante, en las estirpes mutantes de PalB que carecen del dominio MIT, cuyo fenotipo es similar al de las estirpes con mutaciones de pérdida parcial de función en los genes *pal*^{116,182}, se ha demostrado que existe una proporción de la proteína mutante que se asocia a membranas¹¹⁶, aunque dicha proporción es menor que en el caso de la proteína silvestre. Esto indica que la localización de PalB en membranas mediada por Vps24 es necesaria para el procesamiento de PacC⁷² pero que existen otros factores no identificados que contribuyen a la localización de PalB en membranas¹¹⁶.

1.4.7. Reclutamiento de las proteínas del complejo inferior a las membranas de los endosomas: el dominio MIT y el dominio Bro1

El complejo ESCRT-III actúa a modo superficie de anclaje para PalA y PalB. PalB, como se ha mencionado, se une a Vps24 a través del dominio MIT. Este dominio se encuentra conservado en proteínas relacionadas con la organización de los microtúbulos (espastina) y con el tráfico endosomal (Vps4, Vta1)¹⁹⁹. La estructura atómica del dominio MIT de las AAA-ATPasas Vps4A y Vps4B de humanos ha demostrado que está formado por tres α -hélices, A, B y C. Las α -hélices A y C son paralelas entre sí, y antiparalelas con respecto a la α -hélice B, lo que recuerda a las tres primeras hélices de un dominio TPR (tetratricopeptide repeat)^{85,89,199}. El dominio MIT de Vps4p, y de su homólogo en humanos VPS4A, se unen a los motivos MIM de Vps2p y Did2p^{46,82} y de CHMP1A, B y CHMP2A, B^{85,199} respectivamente. El motivo MIM se localiza en la región C-terminal de estas proteínas, en una α -hélice que se caracteriza por la presencia de residuos hidrofóbicos, implicados directamente en la interacción con el dominio MIT, los cuales están separados por residuos polares^{82,85,200}. En el caso de PalB se ha demostrado que su dominio MIT une específicamente a Vps24, muy débilmente a DidB (homólogo de Did2p) y no une a Vps2¹¹⁶.

La estructura de la región C-terminal de CHMP1A, B y CHMP2A, B es muy parecida a la de la región C-terminal de CHMP4A, B, C los homólogos humanos de Vps32¹⁹⁸. Sin embargo, la región C-terminal de las isoformas de CHMP4 es reconocida de manera específica por el dominio Bro1 de la proteína ALIX (homólogo de Rim20/PalA), y no une el dominio MIT de VPS4²⁰⁰. La unión a Vps32/CHMP4 es una función conservada del dominio Bro1, ya que además de Bro1p en *S.cerevisiae*^{96,190} y ALIX en metazoos¹⁸⁹, otras tres proteínas con dominio Bro1, Rim20p/PalA y las proteínas humanas HD-PTP y Brox, también se unen a Vps32 y CHMP4 respectivamente^{69,100,110,201}. De estas tres proteínas con dominio Bro1 se desconoce la función de Brox, mientras que se sabe que la interacción de Vps32/CHMP4 con HD-PTP es más importante en la formación de los MVBs que la interacción de Vps32/CHMP4 con ALIX²⁰². Por otro lado, mutaciones en el dominio Bro1 de ALIX, que previenen su unión a Vps32, impiden el proceso de gemación del virus HIV-1 y la citocinesis^{200,203-205}. Esto

refleja la implicación del ESCRT-III, o al menos de la subunidad Vps32 del ESCRT-III, en múltiples procesos celulares, y señala al dominio Bro1 como la región a través de la cual las distintas proteínas implicadas en estos procesos interaccionan con Vps32.

En *A. nidulans* existen tres proteínas en las que se ha identificado el dominio Bro1: BroA, homólogo de Bro1p¹³⁷, PalA^{100,120} y PalC¹³⁵ (este trabajo). PalA y PalC forman parte de la ruta de pH, mientras que la función de BroA estaría restringida a la formación de los MVBs, de acuerdo con los datos de *S. cerevisiae*. Antes del comienzo de este trabajo no se había demostrado si la similitud de la región N-terminal de PalC reflejaba que era capaz de interaccionar con Vps32 a través de esta región.

1.5 LA MAQUINARIA DE LOS COMPLEJOS ESCRT EN LA CITOCINESIS

En células de mamíferos se ha descrito que los retrovirus, como el HIV, adquieren su envoltura y salen de la célula infectada utilizando los complejos ESCRT, ya que pueden secuestrar sus componentes y dirigir la maquinaria implicada en la formación de los MVBs a la membrana plásmatica para dar lugar a la gemación de una partícula embebida en la membrana plasmática desde el citosol al exterior celular (revisado en Morita et al.^{206,207}). Recientemente, se ha descrito que los ESCRTs participan también en el proceso de abscisión durante la citocinesis^{203-205,208}. Tanto la formación de los MVBs como la gemación de los retrovirus y la abscisión se resuelven, en último término, con la fisión de la membrana, ya sea endosomal o plasmática, por lo que se presume que los complejos ESCRT median esta fisión y son específicamente reclutados a diferentes localizaciones subcelulares para desempeñar dicha función en diferentes procesos biológicos²⁰⁴.

En células animales la citocinesis comienza poco después de la separación de las cromátidas hermanas en anafase. Perpendicular al huso mitótico, se forma un anillo contráctil en el córtex celular compuesto, principalmente, por moléculas de miosina y filamentos de actina. El movimiento de la miosina a lo largo de los filamentos de actina provoca que la membrana celular forme un surco, denominado surco de segmentación (“cleavage furrow”). El anillo se estrecha gracias a la acción de la miosina hasta que, al final de la telofase, forma una estructura llamada cuerpo medio (“midbody” o “Flemming body”), compuesta principalmente por filamentos de actina y restos de microtúbulos procedentes del huso. Por último, durante el proceso de abscisión se produce la división del cuerpo medio y la escisión de la membrana plasmática (revisado en Glotzer et al.²⁰⁹). La proteína CEP55, que participa en el proceso de abscisión, recluta a la proteína del ESCRT-I, TSG101 (el ortólogo de Vps23), y a ALIX a los cuerpos medios^{203,204}. El papel de TSG101 y ALIX en la abscisión seguramente está relacionado con el ensamblaje del ESCRT-III en los cuerpos medios^{204,208}, como demuestra el hecho de que mutaciones en el dominio Bro1 de ALIX, que previenen su unión a CHMP4²⁰⁴, impiden que se complete la citocinesis (Figura I.-11). Lo mismo ocurre cuando se sobreexpresan proteínas mutantes no funcionales del ESCRT-III, o de VPS4, que se comportan como dominantes negativos²⁰⁴. El ESCRT-III es, sin duda, un candidato a mediar la escisión de la membrana plasmática²⁰⁸. Como se ha mencionado anteriormente, este complejo se ensambla sobre las membranas formando anillos o espirales, que provocan cierta deformación de la

membrana ⁷⁶. No obstante, el papel de los otros complejos ESCRTs en la división celular es una cuestión que permanece abierta, dado que, aunque el ESCRT-II se localiza en los centrosomas ^{210,211}, parece que no desempeña una función asociada a la citocinesis, y todavía se desconoce el significado fisiológico de las interacciones que han sido detectadas mediante doble híbrido entre otros componentes del ESCRT-0 y del ESCRT-I con CEP55 ²⁰⁴. Además recientemente se ha descrito la interacción de CHM1PB (homólogo a Did2p) con el dominio MIT de la espastina, una AAA-ATPasa que interacciona en los microtúbulos y que posiblemente este implicada en el desensamblaje del huso mitótico en la proximidad del cuerpo medio ^{212,213}. De todas formas, estos resultados parecen indicar que los complejos ESCRTs funcionan como una maquinaria modular implicada en la escisión de membranas, que es reclutada a su sitio de actuación mediante interacciones con el Ptdns(3)P de la membrana endosomal y la ubiquitina de los cargos endocíticos en el caso de la biogénesis de los MVBs, o mediante interacciones con proteínas específicas en el caso de la citocinesis ²⁰⁸ o de la gemación de los retrovirus ²¹⁴.

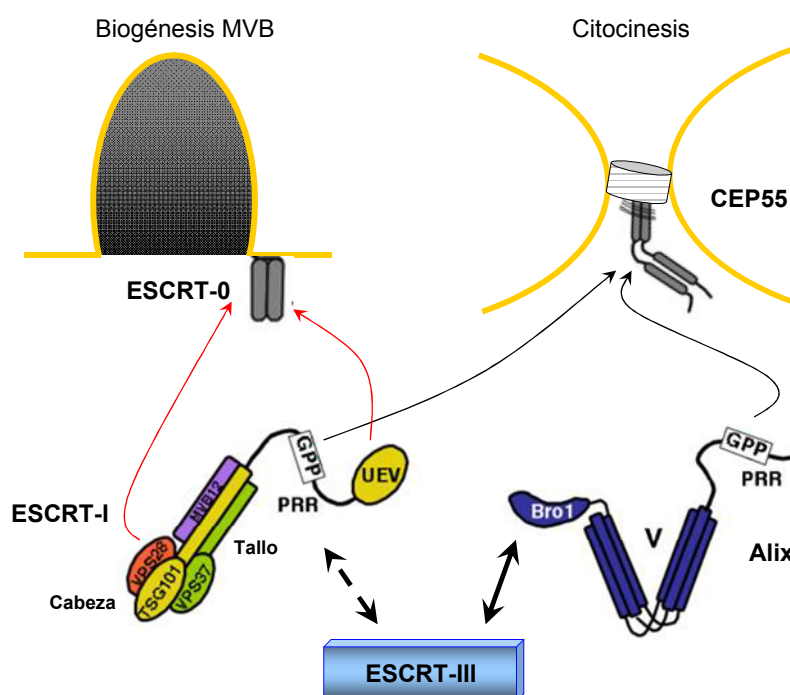


Figura I.-11: Representación esquemática de las funciones de ESCRT-I y ALIX en la biogénesis de los MVBs y en la citocinesis en mamíferos. Tanto TSG101 (Vps23) del ESCRT-I como ALIX interaccionan con la proteína del “cuerpo medio”, CEP55, mediante el motivo GPP (flechas negras). En la biogénesis de los MVBs, TSG101 interacciona mediante su dominio de unión ubiquitina UEV, con la ubiquitina del cargo que va ser internalizado en las ILVs, mientras que VPS28 interacciona con ESCRT-0 (flechas rojas). Tanto Alix como ESCRT-I reclutan a ESCRT-III, ya sea mediante una interacción directa (ALIX interacciona directamente por su dominio Bro1 con la proteína del ESCRT-III Vps32 (flecha continua), o indirecta [mediante el ensamblaje del ESCRT-II, en el caso de ESCRT-I (flecha discontinua)] ^{202,212}.

Dada la conservación de función entre hongos y metazoos de las proteínas Vps implicadas en la ruta del MVB, se podría esperar que los complejos ESCRTs tuviesen también una función relacionada con la división celular en hongos. Sin embargo, en *S. cerevisiae* las proteínas de los ESCRTs no son esenciales ni en la

citocinesis ni en la cariocinesis^{50,65}. La mitosis en hongos ascomycetes es cerrada, lo que significa que la membrana nuclear se mantiene intacta durante la mitosis. Sin embargo, el mecanismo de la citocinesis está relativamente conservado, como lo demuestra el hecho de que en la constricción entre la célula hija y la célula madre también existe un anillo contráctil formado por filamentos de actina²¹⁵, donde se han identificado proteínas como las septinas (revisado en Douglas et al.²¹⁶). Estas proteínas, conservadas en metazoos²¹⁵ y que juegan un papel fundamental en la citocinesis, se identificaron en primer lugar en *S. cerevisiae*²¹⁷. Sin embargo, en ninguna de las estirpes en las que se han deleccionado los distintos genes de los complejos ESCRTs se han descrito efectos relacionados con la división celular¹¹²⁻¹¹⁴.

En el caso de *A. nidulans* se ha demostrado que *vps23* (ESCRT-I), *vps36* (ESCRT-II), *vps20*, *vps32* y *vps24* (ESCRT-III) son genes esenciales¹¹⁶ (Calcagno et al., resultados sin publicar). Esto puede indicar que, en *A. nidulans*, la biogénesis de los MVBs cumple un papel fundamental, directa o indirectamente, para la viabilidad celular, debido a las características inherentes al crecimiento hifal, que lo diferencian de *S. cerevisiae*. No obstante, otra posibilidad, altamente especulativa, es que los genes *vps* citados sean esenciales porque, a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae*, desempeñen otra función no relacionada con la biogénesis de los MVBs, pero quizá asociada a la división celular. Hay que tener en cuenta que *A. nidulans* es un hongo cenocítico, por lo que la situación en la que se produce la división celular es muy diferente de lo que sucede en *S. cerevisiae*. La mitosis en los dos hongos se caracteriza por que no desaparece la membrana nuclear. El centro organizador de microtúbulos (MTOC) en estos dos organismos, denominado “spindle pole body”, está integrado en la membrana nuclear, por lo que no es necesario que ésta desaparezca para que se forme el huso mitótico por la polimerización de los microtúbulos (revisado en De Souza et al.²¹⁸). Sin embargo, en *A. nidulans* la permeabilidad de la membrana nuclear cambia drásticamente durante la mitosis, dado que existe un desensamblaje parcial de los poros nucleares²¹⁹. La mayor diferencia entre estos dos organismos es que en *A. nidulans*, debido a que es un hongo cenocítico, la citonesis y la cariocinesis están asociadas pero no se producen en el mismo lugar, como sucede en *S. cerevisiae*. En *A. nidulans* se produce nucleocinesis de todos los núcleos de una célula de forma más o menos sincrónica pero la división celular no se completa hasta la aparición de septos cada cierto número de núcleos que se han dividido (revisado en Harris et al.²²⁰). En la región donde se forma el septo también aparece un anillo de filamentos de actina que se contrae hacia el centro de la hifa, junto con la membrana plasmática. Se ha descrito que la separación de los dos núcleos durante el proceso de la cariocinesis se debe a un doble estrangulamiento de la membrana nuclear, que da lugar a los dos núcleos y a un remanente de la membrana nuclear formado por la región que queda entre los dos estrangulamientos (Osmani, 9th European Congress on Fungal Genetics, 2008, comunicación oral), lo que concuerda con las observaciones realizadas en células humana en la que se ha visto que la espastina asociada a CHMP1B (homólogo a Did2p), se localiza en dos acúmulos ambos lados del cuerpo medio^{221,222}, que posiblemente represente sitios en los que se produce el desensamblaje de los microtúbulos que forman el huso y la escisión de la membrana plasmática.

Teniendo en cuenta todos estos datos, la hipotética función del ESCRT-III en la división celular en *A. nidulans* podría estar implicada en la escisión de la membrana plasmática en la septación, en la escisión de la membrana nuclear en la cariocinesis, o en ambas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

I. Determinar por métodos bioquímico y “ex vivo” si palc está asociado al complejo ESCRT-III

En *S. cerevisiae*, todos los componentes de los complejos ESCRT-I, ESCRT-II así como Vps32p y Vps20p son necesarios para la señalización por pH ambiental. Los genes que codifican para las proteínas del complejo ESCRT-III, así como sus proteínas accesorias no habían sido identificados en *A. nidulans*. Los componentes del ESCRT-III sirven como anclaje de PalA y PalB^{100,179} en el hipotético complejo de señalización de pH asociado a la membrana del endosoma. La caracterización de las proteínas que componen el ESCRT-III constituye un estudio preliminar esencial para comprender el papel del complejo ESCRT-III en la señalización por pH. La hipótesis de partida fue que PalC podría interactuar con algunas de las proteínas de este complejo, al igual que PalA y PalB. Esta hipótesis se basa en que la región N-terminal de PalC tiene una relativa similitud con el dominio Bro1, un dominio implicado en la unión a Vps32 de las proteínas que lo contienen.

II. Identificar el ortólogo de palc en *S. cerevisiae*

Se han identificado ortólogos de PalC en otros hongos *euscomycetes*, *basidiomycetes* y *zigomycetes*¹³². Sin embargo, no se han identificado ortólogos de PalC en *S. cerevisiae*. El hallazgo de un ortólogo de PalC en *S. cerevisiae* permitiría plantear un modelo de transducción de la señal de pH aplicable tanto a *A. nidulans* como a *S. cerevisiae*.

III. Determinar la localización de PalC y PalA

Se ha estudiado la localización de PalI y PalH, dos de los componentes del complejo de señalización situado en membrana plasmática¹³³. Antes del comienzo de este trabajo, PalC era la única proteína de la ruta de señalización por pH que no había sido situada en ninguno de los dos hipotéticos complejos involucrados en la señalización por pH. Por ello nos planteamos el estudio de la localización de PalC y del papel que juegan el resto de los componentes de la ruta pH en dicha localización, con el objetivo de determinar su pertenencia funcional a uno u otro complejo. Por otro lado, se decidió analizar la regulación de la localización de PalA como componente prototípico del complejo de la ruta de pH localizado en la membrana del endosoma, ya que interactúa con Vps32 y con PacC^{72 100}.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MEDIOS PARA *Aspergillus nidulans*

Todos los cultivos, tanto en medio sólido como líquido, se realizaron a 37°C, a no ser que se indique lo contrario. Los cultivos en medio líquido se inocularon con $\sim 3 \times 10^6$ conidiosporas/ml (procedentes de una suspensión en Tween 80 al 0.01%) y se cultivaron en agitación a 250 r.p.m. La solución de elementos traza y suplementos empleados en los medios de *Aspergillus* son los descritos por Cove²²³.

3.1.1. MEDIO COMPLETO (MCA)

Composición por litro: 20 ml de solución de sales (*vide infra*), 10 ml de solución de casaminoácidos (*vide infra*), 10 g de D-glucosa, 2 g de bactopectona y 1 g de extracto de levadura. Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave 20 minutos a 110 °C y 0,5 bar y, antes de ser utilizado, se le añadió 10 ml de solución de vitaminas (*vide infra*) y, en caso de necesitarse, los requerimientos específicos de cada estirpe.

3.1.2 MEDIO MÍNIMO (MMA)

Para 1 litro de medio se utilizaron 20 ml de solución de sales (*vide infra*) y 76 g de NaH_2PO_4 y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110 °C y 0,5 bar. Para el medio mínimo sólido se añadió agar Oxoid al 1% (p/v) antes de la esterilización. Posteriormente, se añadieron, tanto al medio sólido como al líquido, los suplementos necesarios para cada estirpe, así como la fuente de carbono y la de nitrógeno, generalmente D-glucosa 1% (p/v) y tartrato diamónico 5 mM, respectivamente. Para el análisis al microscopio de fluorescencia de las distintas estirpes, se utilizó una versión del MMA líquido denominada “*watch minimal medium*” (WMM). En condiciones estándar, este medio contenía 25mM NaH_2PO_4 (en lugar de 0,5 mM de NaH_2PO_4 del MMA) y estaba suplementado con 17 mM KCl y 5mM MgSO_4 , además de la solución de sales.

3.1.3 MEDIO DE FERMENTACIÓN (MFA)

Este medio incluye como principal componente 25 g/l de CSL (Corn Steep Liquor) (lotes Cerestar-2062 o Laisa-60015). Se mezclaron bien las fases acuosa y sólida del CSL antes de pesarlo y, una vez pesado, se añadió el agua destilada y la solución de sales (20 ml/L) (*vide infra*). Se agitó durante 20 minutos y se filtró al vacío utilizando un papel de filtro. El pH se ajustó a un valor de 6,8 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 110 °C durante 20 minutos. Antes de ser utilizado se añadió, además de los suplementos específicos

MATERIALES Y MÉTODOS

de cada estirpe, sacarosa al 3% (p/v) y tartrato de amonio 5 mM, como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente.

3.1.4 SOLUCIÓN DE SALES Y SUPLEMENTOS PARA MEDIOS DE *A. nidulans*

Solución de sales sin fosfato.

Para 1 litro (concentración 50X):

KCl.....	26 g
Mg ₂ SO ₄ 7H ₂ O.....	26 g
Solución de elementos traza sin fosfato.....	50 ml

Solución de casaminoácidos.

Hidrolizado de caseína, 150 g/litro. Esterilizar en autoclave 110 °C, 20 minutos, 0,5 bar. Se utilizó como solución 10X.

Solución de elementos traza sin fosfato.

Para 1 litro (concentración 1000X):

Na ₂ B ₄ O x 10H ₂ O.....	40 mg
CuCl x 2H ₂ O.....	400 mg
FeCl ₃	800 mg
ZnCl ₂	8 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O.....	800 mg

Solución de vitaminas*.

Para 1 litro (concentración 100X):

Tiamina.....	50 mg
Biotina.....	100 mg
Ácido nicotínico.....	100 mg
D-pantotenato de calcio.....	200 mg
Piridoxina-HCL.....	50 mg
Riboflavina.....	100 mg
Inositol.....	24 g

*Esta solución se esterilizó mediante filtración y se guardó a 4°C protegida de la luz.

Suplementos.

Inositol: 24 g/L (65 mM) (esterilizado por filtración). Concentración final 650 µM.

Biotina: 100 mg/L (0,4 mM) (esterilizada por filtración). Concentración final 0,04 µM.

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 200 mg/L (1,4 mM). Autoclave. Concentración final 14 µM.

Pantotenato de calcio: 600 mg/L (2,4 mM) (esterilizado por filtración). Concentración final 24 µM.

Piridoxina-HCL (Vitamina B6): 50 mg/L (250 µM) (esterilizada por filtración). Concentración final 2,5 µM.

Cada una de estas soluciones se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.

3.1.5 AJUSTE DEL pH EN MEDIOS DE *A. nidulans* EN CONDICIONES NO ESTÁNDAR

En condiciones estándar los medios de *A. nidulans* tienen un pH de 6,5-6,8; no obstante, para analizar la función de la ruta *pal* se requieren medios ajustados a valores de pH por encima y por debajo de estos valores. En función de las características del medio y de las condiciones experimentales se emplearon distintas formas de tamponar los medios a distintos valores de pH.

En la observación de las células al microscopio de fluorescencia, se empleó el medio WMM tamponado a pH ácido con 25 mM de NaH_2PO_4 (pH ~ 5,1-5,2) (condiciones en la cuales la ruta *pal* no está activa), tamponado a pH neutro con 12,5 mM NaH_2PO_4 y 12,5 mM Na_2HPO_4 (pH ~ 7), y tamponado a pH alcalino con 25 mM Na_2HPO_4 (pH ~ 8,1-8,2) (en estas dos últimas condiciones la ruta *pal* está activa). De forma análoga, el medio MFA se tamponó, según el caso, a pH ácido con 100 mM NaH_2PO_4 y 100 mM NaCl (MFA ácido, pH 5,5), a pH neutro con 50 mM NaH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 y 50 mM NaCl (MFA neutro, pH 6,8) y a pH alcalino con 100 mM Na_2HPO_4 (MFA básico, pH 8). En los experimentos de cambio de pH, el medio MFA se tamponó a pH 4,5 con 50 mM citrato de sodio pH 3,5, o a pH 8,4 con HEPES 100 mM y NaOH (véase Material y Métodos, apartado 3.6.5). Por último, en medio sólido MMA o MCA se empleó 200mM Na_2HPO_4 (pH ~ 8) o 100 mM HEPES (pH ~ 8,2-8,4 ajustado con NaOH), para alcalinizar el medio, y 500 mM de NaH_2PO_4 (pH ~ 5) o 100 mM citrato de sodio (pH ~ 4,5 ajustado con NaOH) (véase Material y Métodos, apartado 3.6.1.2).

3.2 MEDIOS PARA *Saccharomyces cerevisiae*

Todos los cultivos, tanto en medio sólido como líquido, se realizaron a 30°C. Los cultivos en medio líquido [procedentes de un precultivo en fase estacionaria (es decir, por encima de 1,5 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm)] se cultivaron en agitación a 250 r.p.m. hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (0,8-1 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm).

3.2.1 MEDIO COMPLETO DE LEVADURA (YPD E YPDA)

Composición por litro: 20 g de peptona, 20 g de D-glucosa, 10 g de extracto de levadura. El pH se ajustó a 5,8 con HCl, y el medio se autoclavó 20 minutos a 110 °C y 0,5 bar. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (p/v). El medio completo (YPD) se suplementó con adenina hemisulfato a una concentración final del 0,2% (200 mg/L). Este medio se denominó YPDA.

3.2.2 MEDIO MÍNIMO DE LEVADURA (SD)

Para 400 ml de medio líquido se utilizaron 2,68 g de YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, Difco) en 320 ml de agua destilada. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (p/v). Una vez autoclavado el YNB a 110 °C durante 20 minutos, se añadió D-glucosa a una concentración final del 2% [40 ml de D-glucosa al 20% (p/v)] y 40 ml de 10X Dropout -trp, -leu, -his, -ade (*vide infra*). Este medio se suplementó con los requerimientos específicos necesarios para cada cepa y condición.

3.2.3 SOLUCIÓN DE SALES Y SUPLEMENTOS PARA MEDIOS DE *S. cerevisiae*

Solución Dropout -trp, -leu, -his, -adenina, -uracilo.

Para preparar la solución Dropout a una concentración 10X se disolvieron los aminoácidos que aparecen en la lista siguiente a las concentraciones indicadas:

L-arginina HCl.....	20 mg/100 ml
L-isoleucina.....	30 mg/100 ml
L-lisina HCl.....	30 mg/100 ml
L-metionina.....	20 mg/100 ml
L-fenilalanina.....	50 mg/100 ml
L-treonina.....	200 mg/100 ml
L-tirosina.....	30 mg/100 ml
L-valina.....	150 mg/100 ml

La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.

Soluciones de requerimientos para complementar la solución Dropout.

Los requerimientos necesarios para complementar la solución Dropout se prepararon a una concentración 100X en agua destilada:

L-adenina hemisulfato.....	200 mg/ml
L-uracilo.....	200 mg/ml
L-histidina HCl monohidrato.....	200 mg/ml
L-leucina.....	1 g/ml
L-tritófano.....	200 mg/ml

Cada una de las soluciones se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C. Para la selección de transformantes de levaduras se añaden los requerimientos específicos al medio SD según los marcadores de transformación usados.

3.3 MEDIOS DE CULTIVO DE *Escherichia Coli*.

Se utilizó LB ²²⁴ como medio general para el crecimiento y mantenimiento de cepas transformadas. Este medio contiene: Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se añadió agar al 1,5% (p/v) para el medio sólido. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C y 0,5 bar.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina se añadió este antibiótico a una concentración final de 100 µg/ml tanto en medio sólido como líquido. Para transformantes resistentes a kanamicina la concentración final del antibiótico fue de 50 µg/ml. Cuando se realizó la selección de transformantes por ausencia de actividad de la proteína reportera β-galactosidasa se añadió al medio X-gal, a una concentración final de 83 mM y, según los casos, IPTG, a una concentración de 100 µM.

3.4 CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADA.

3.4.1 CEPAS DE *Aspergillus nidulans*

Las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se enumeran en la Tabla M.-1. Todas las estirpes portan la mutación *veA1* de pérdida de función en *veA* (Velvet), que permite la conidiación profusa en presencia de luz ²²⁵. Los marcadores se describen en Clutterbuck ²²⁶.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
MAD0002	<i>biA1</i>	C. Scazzocchio (Orsay)
MAD0134	<i>wA31 biA palA1</i>	H. Arst (Londres)
MAD0171	<i>palC4 inoB2</i>	H. Arst (Londres)
MAD0305	<i>pabaA1 pacC^c14</i>	J. Tilburn (Londres)
MAD0858	<i>biA1 palA34 areA^r160 areA^r168 pantoB100</i>	H. Arst (Londres)
MAD0878	<i>pantoB100 palB38</i>	H. Arst (Londres)
MAD1046	<i>wA2 pabaA1 pyroA4</i>	M.Peñalva (Madrid)
MAD1112	<i>yA2 areaAr18 argB2 palC4 inoB2</i>	S. Negrete (Londres)
MAD1117	<i>yA2 argB2 pantoB100</i>	E.Espeso (Londres)
MAD1129	<i>yA2 areAr18 argB2[argB[*]::alcA^p::GFP] palC4 inoB2</i>	No consta
MAD1147	<i>yA2 areAr18 argB2 [argB[*]::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	A.Hervás(Madrid)
MAD1174	<i>palH72 argB2 pantoB100</i>	H. Arst (Londres)

MAD1237	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] pantoB100</i>	M.Peñalva (Madrid)
MAD1373	<i>yA2 pabaA1 palC::GFP</i>	M.Peñalva (Madrid)
MAD1425	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::argB</i>	B. Oakley (Ohio)
MAD1428	<i>yA2 pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1437	<i>yA2 argB2[argB*::alcA^p::GFP::RabA]</i>	E.Reoyo (Madrid)
MAD1471	<i>yA2 argB2 [argB*:: alcA^p::vps32::GFP] pantoB100</i>	O.Rodríguez (Madrid)
MAD1534	<i>riboB2 ΔnkuA::argB ΔdidB::pyrGfum</i>	O.Rodríguez (Madrid)
MAD1558	<i>yA2 argB2 [argB*::gpdA^p::YGR122w] palC185 pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1559	<i>yA2 argB2 palC185 pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1560	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::GFP::palC(446-507)] pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1561	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::GFP::palC(446-507)] pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1562	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::palC(1-454)::GFP] pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1563	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::palC(1-454)::GFP] pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1697	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{R442Δ}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1698	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{R442Δ}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1699	<i>yA2 areA'18 argB2[argB*::alcA^p::palC^{R442A}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1700	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{R442A}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1701	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{Y451A}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1702	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::PalC^{Y451A}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1703	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{P439F}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1704	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC^{P439F}::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1705	<i>yA2 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 abpA::mRFP::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD1708	<i>yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2 abpA::mRFP::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD1737	<i>pyroA4 pyrG89 pacC⁹⁰⁰ ΔnkuA::argB</i>	H. Arst (Londres)
MAD1741	<i>wA1 pyroA4 inoB2 niiA4</i>	H. Arst (Londres)
MAD1804	<i>pyrG89 ΔrabA::pyrGfum pyroA4 ΔnkuA::argB</i>	J.F. Abenza (Madrid)
MAD1811	<i>palC4 inoB2 pacC900</i>	Este trabajo
MAD1814	<i>palH72 yA2 areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1815	<i>palH72 yA2 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1816	<i>pabaA1 yA2 palA34 areA'160 inoB2 palC::GFP</i>	Este trabajo
MAD1817	<i>biA1 palA34 palC::GFP</i>	Este trabajo
MAD1818	<i>palH72 palC::GFP pantoB100</i>	Este trabajo
MAD1819	<i>palH72 pabaA1 palC::GFP</i>	Este trabajo
MAD1820	<i>pabaA1 argB2 pyroA4 [pyroA*::gpdA^{minip}::vps32]</i>	Este trabajo
MAD1822	<i>pabaA1 argB2 pyroA4[pyroA*::gpdA^{minip}::HA::vps32]</i>	Este trabajo
MAD1838	<i>biA1 areA'160 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] inoB2</i>	Este trabajo
MAD1839	<i>yA2 palA34 areA'160 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1840	<i>yA2 palA34 areA'160 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1856	<i>pyroA4 [pyroA*::gpdA^{minip}::vps32] argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1857	<i>pyroA4[pyroA*::gpdA^{minip}::HA::vps32] argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1866	<i>ΔrabA::pyrGfum palC::GFP¿pyrG89?</i>	J.F. Abenza (Madrid)
MAD1873	<i>yA2 ΔrabA::pyrGfum areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD1874	<i>ΔrabA::pyrGfum areA'18 argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4inoB2 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD1913	<i>argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 pyroA4 pantoB100 ΔdidB::pyroA</i>	Este trabajo
MAD1915	<i>argB2 [argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1920	<i>pyrG89 yA2 pabaA1 palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1921	<i>pyrG89 yA2 vps32::mRFP::pyrGfum::vps32 argB2[argB*::alcA^p::palC::GFP] palC4</i>	Este trabajo

MAD1924	<i>pabaA1 argB2[argB*::alcA^P::vps32::GFP] pyroA4</i>	Este trabajo
MAD1990	<i>pyrG89 yA2 areA^r18 argB2[argB*::alcA^P::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD1991	<i>pyrG89 slaB::mRFP pyroA4 ΔnkuA::bar</i>	Este trabajo
MAD1993	<i>pyrG89 slaB::mRFP areA^r18 argB2[argB*::alcA^P::palC::GFP] palC4 inoB2</i>	Este trabajo
MAD2213	<i>wA1 inoB2 pyroA4[pyroA*::alcA^P::palA::GFP] niiA4</i>	Este trabajo
MAD2214	<i>pyrG89 palC301 pyroA4 ΔnkuA::bar; pacC900</i>	Este trabajo
MAD2216	<i>pyrG89 palC::300 pyroA4 ΔnkuA::bar pacC900</i>	Este trabajo
MAD2218	<i>pyrG89 ΔpalC::pyroAfum pyroA4 ΔnkuA::bar pacC900</i>	Este trabajo
MAD2220	<i>pabaA1 palA::GFP inoB2 pyroA4 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2221	<i>palH72 palA::GFP inoB2 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2222	<i>palH72 palA::GFP inoB2 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2223	<i>palA::GFP pyroA4 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2224	<i>palA::GFP inoB2 palB38 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2225	<i>wA1 palA::GFP pyroA4 palB38 ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD2226	<i>yA2 pabaA1 palC::GFP palF15</i>	Este trabajo
MAD2227	<i>yA2 palC::GFP palF15</i>	Este trabajo
MAD2228	<i>yA2 palC::GFP pantoB100</i>	Este trabajo
MAD2229	<i>yA2 pabaA1 palI32 argB2 palC::GFP</i>	Este trabajo
MAD2230	<i>yA2 pabaA1 palI32 palC::GFP</i>	Este trabajo
MAD2396	<i>pyrG89 palC302 pyroA4 ΔnkuA::bar pacC900</i>	Este trabajo
MAD2397	<i>wA1 inoB2 pyroA4[pyroA*::alcA^P::palA::Cherry] niiA4</i>	Este trabajo

Tabla M.-1: Cepas de *A. nidulans* utilizadas en esta Tesis

3.4.2 CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

En los ensayos de doble híbrido se han utilizado las cepas: Y187: (*MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-112 gal4Δ, met15Δ, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1*)²²⁷ y AH109 (*MATα trp1-901 leu2-112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 MEL1::GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*)²²⁸.

En el estudio de la complementación cruzada entre *palC* e *YGR122w* se utilizó un mutante de delección derivado de la cepa BY4742 (*MATα his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; YGR122wΔ*).

3.4.3 CEPAS DE *Escherichia coli*

En este trabajo se han utilizado las estirpes de *E. coli* DH1 (*F- recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44*), DH5α [*F' endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1 Δ(lacIZYA-argF')*] y GM119 (*dam-3 dcm-6 galK2 galT22 lacY1 metB1 supE44 thi-1 tonA32 tsx-78*). Las estirpes DH1 y DH5α se han utilizado como cepas de alta frecuencia de transformación, y en particular la estirpe DH5α para la selección de plásmidos recombinantes utilizando *lacZ* como marcador de selección. La estirpe GM119 se utilizó ocasionalmente cuando fue necesario amplificar DNA plasmídico sin que este DNA estuviese metilado por la metilasa Dam.

3.5 VECTORES UTILIZADOS

Los plásmidos que se han utilizado en esta tesis se enumeran en las Tablas M.-2, M.-3 y M.-4, y los oligos empleados en su construcción en la Tabla M.-5. Cuando fue necesario se verificó la correcta inserción de mutaciones y epítomos mediante su secuenciación. En los pasos intermedios de construcción de alguno de estos vectores se ha empleado el plásmido pBS-SK+ de Stratagene. En el clonaje y propagación de fragmentos de PCR se han utilizado los vectores comerciales pCR2.2-TOPO de Invitrogen (Ref. K4500-01) y pGEM-Teasy de Promega (Ref. A1360). A continuación, se detalla la construcción de los plásmidos.

3.5.1 PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE *Aspergillus nidulans*

***palCA::palC::GFP* (p1378) y *palCA::palC*::GFP* (p1593, p1605, p1606, p1653, p1654, p1663)**

El vector *palCA::palC::GFP* (p1378) se construyó a partir del plásmido *alcA::GFP* (p1145)¹⁴⁸, en el cual se clonó en el sitio BamHI un fragmento de 1587pb que contenía la secuencia codificante del gen *palC*. Este fragmento se obtuvo por PCR usando como molde DNA genómico y los cebadores BamHI-PalCdown (Tabla M.-5, código 87) y BamHI-PalCup (Tabla M.-5, código 88). Dicho fragmento se clonó primero en pBS-SK+ para dar lugar al plásmido p1490 y se utilizó este último como molde para obtener, mediante mutagénesis dirigida (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 37-49) distintas versiones mutantes de *palC*. Los plásmidos con las versiones mutantes de *palC* se digirieron con la enzima BamHI y el fragmento de 1587 pb resultante se clonó en el plásmido *alcA::GFP* (p1145). De esta forma, se obtuvieron los plásmidos p1593, p1606, p1653, p1654, p1663 (Tabla M.-2). Para la construcción del plásmido p1605 (Tabla M.-2), se mutagenizó el plásmido p1145 para eliminar el codón stop de la GFP (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 27 y 28) y se clonó el fragmento *palC*446-507, obtenido por PCR (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 53 y 54), en este nuevo plásmido. Estos plásmidos se usaron para transformar las estirpes MAD1117, y MAD 1129 para obtener estirpes con un transgén en *argB* que expresase PalC::GFP mutantes bajo el control del promotor del gen *alcA*.

Plásmidos derivados de *pCONS-2* (p1444) y *pgpd003* (p1660)

El plásmido *pCONS-2* (p1444) se usó para la obtención de estirpes con un transgén en *argB* que se expresase bajo el promotor constitutivo del gen que codifica para la *glicerol-3-fosfato deshidrogenasa* (*gpd^p*). Los cDNAs de *palC* e *YGR122w* se clonaron mediante las dianas de restricción BamHI-EcoRI en *pCONS-2*, para dar lugar a los plásmidos p1612 y p1617 respectivamente.

El plásmido *pgpd003* (p1660) se usó para la obtención de estirpes con un transgén integrado en *pyroA4* que se expresase bajo una forma atenuada del promotor del gen *gpd*, *gpd^{mini}*. El cDNA de *vps32* se amplificó por PCR a partir del plásmido p1558 (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 65 y 86) y se clonó mediante las dianas de restricción HindIII y EcoRI en *pgpd003* para dar lugar al plásmido p1697. En el caso del plásmido p1696, se etiquetó el cDNA *vps32* con una copia del epítipo HA mediante subclonaje del cDNA en el vector de 2H pACT2, se amplificó por PCR la construcción *HA::vps32* (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 85 y 86) y se

clonó en *pgd003* mediante las dianas HindIII y EcoRI, para dar lugar al plásmido p1696. Para construir el plásmido p1721, derivado de *pgd003*, se clonó en la diana de restricción HindIII de este vector la secuencia de la mRFP y posteriormente se clonó en el plásmido resultante el cDNA de *vps32* en la diana de restricción EcoRI.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	FUENTE
1145	<i>palcA^P::GFP</i>	J.M. Mingot
1263	<i>palcA^P::palC</i>	E.Espeso
1378	<i>palcA^P::palC::GFP</i>	A.Hervás
1439	<i>pGFP-tagging</i>	Osmani
1444	<i>pCONS-2</i>	J.M.Rodríguez
1593	<i>palcA^P::palC::^{R442Δ}::GFP</i>	Este trabajo
1605	<i>palcA^P::GFP::palC(446-507)</i>	Este trabajo
1606	<i>palcA^P::palC(1-454)::GFP</i>	Este trabajo
1612	<i>pgpdA^P::cDNA_{palC}</i>	Este trabajo
1617	<i>pgpdA^P::YGR122w</i>	Este trabajo
1653	<i>palcA^P::PalC^{Y451A}::GFP</i>	Este trabajo
1654	<i>palcA^P::PalC^{R442A}::GFP</i>	Este trabajo
1660	<i>pgpd003</i>	M.Peñalva
1663	<i>palcA^P::PalC^{P439F}::GFP</i>	Este trabajo
1696	<i>pgpdA^{pmini}::HA::vps32</i>	Este trabajo
1697	<i>pgpdA^{pmini}::vps32</i>	Este trabajo
1712	<i>palcA^P::pyroA</i>	A.García
1721	<i>pgpdA^{pmini}::mRFP::vps32</i>	Este trabajo
1731	<i>pTopo-vps32^P::vps32::mRFP::pyrG^{Af}</i>	Este trabajo
1842	<i>palcA^P::palA::GFP</i>	Este trabajo
1843	<i>palcA^P::palA::Cherry</i>	Este trabajo
1851	<i>p5'UTR::palC:HA::3'UTR</i>	Este trabajo
1852	<i>p5'UTR::PalC^{Y506A,Y507A}::HA::3'UTR</i>	Este trabajo
1856	<i>p5'UTR::PalC^{Y506Δ,Y507Δ}::HA::3'UTR</i>	Este trabajo

Tabla M.-2: Plásmidos utilizados para la transformación de *A.nidulans*

vps32^P::vps32::mRFP::pyrG^{Af} (p1731)

Para la construcción del p1731 se amplificó por PCR un fragmento del DNA genómico de *vps32* desde el sitio -600 hasta el final de la secuencia codificante (oligonucleótidos Tabla M.-5, nombres RFP1 y RFP2). Este fragmento se fusionó por PCR con el casete *mRFP::pyrG^{Af}* (oligonucleótidos Tabla M.-5, nombre RFP1 y código B4-9), y el amplicón resultante se clonó en el vector pCR2.2-Topo.

Plásmidos para la sobreexpresión de PalA: *alcA::palA::GFP* (p1842) y *alcA::palA::mCherry* (p1843)

Los plásmidos *alcA::palA::GFP* (p1842) y *alcA::palA::mCherry* (p1843) derivan del plásmido p1721, diseñado para obtener estirpes con un transgén en *pyroA* que se expresa bajo el promotor de *alcA*. El cDNA de PalA se clonó como un fragmento HindIII/ EcoRI en p1721 y, posteriormente, se clonó en fase con la secuencia codificante de PalA la secuencia codificante de la GFP, o de la CherryFP en la diana de restricción EcoRI.

p[5'UTR::palC::HA₃::3'UTR] (p1851)

Para la construcción del plásmido *p[5'UTR::palC::HA₃::3'UTR]* (p1851) se amplificó por PCR un fragmento de DNA genómico de unas 3,6 kb (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 181-184), que contenía 1000 pb de la 5'UTR de *palC*, la secuencia codificante de *palC* y 1000 pb de la 3'UTR de *palC*, y se clonó en el vector pGEM-T Easy. El plásmido resultante se digirió con la enzimas de restricción NcoI y EcoRI, lo que dió lugar a un fragmento de ~1,6 kb y otro de ~6kb. Este último contenía el origen de replicación del vector pGEM-T Easy y uno de sus extremos estaba formado por la 5'UTR de *palC*, mientras que el otro extremo estaba formado por la 3'UTR de *palC*. En este fragmento se clonó la construcción *palC::HA₃::pyrG^{Δf}*, generada mediante PCR de fusión (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 14, 190, B4-1, B4-2), con lo que se obtuvo el plásmido p1851. Sobre este plásmido se construyeron, mediante mutagénesis dirigida, los plásmidos p1852 y p1856 (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos B4-3, B4-4, B4-8 y B4-12).

3.5.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN *Saccharomyces cerevisiae*

pACT2 (p1495)

Plásmido comercial de la casa Clontech (K1604-1), del cual derivan los plásmidos empleados como “presas” en los ensayos de doble híbrido (Tabla M.-3). Los insertos se clonaron en fase con la secuencia codificante del dominio de activación de *Gal4p*.

pGBKT7 (p1302)

Plásmido comercial de la casa Clontech (K1604-1) del cual derivan los plásmidos empleados como “cebos” en los ensayos de doble híbrido (Tabla M.-3). Los insertos se clonaron en fase con la secuencia codificante del dominio de unión al DNA de *Gal4p*. También, se utilizó para la expresión *in vitro* de proteínas en el sistema TNT, a partir del promotor T7.

pRS416

Plásmido centromérico para la expresión de proteínas en estirpes auxótrofas para uridina, en el cual se clonaron los cDNA de *palC* e *YGR122w* para los experimentos de complementación en la estirpe *ygr122wΔ*, derivada de BY4742.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	FUENTE
1480	<i>pGBKT7::palB</i>	O.Rodríguez
1499	<i>pGBKT7::palC</i>	Este trabajo
1500	<i>pGBKT7::didB</i>	O.Rodríguez
1501	<i>pACT2::didB</i>	O.Rodríguez
1523	<i>pACT2::palF</i>	O.Vincent
1524	<i>pACT2::palA</i> ¹⁻⁷⁹⁸	O.Vincent
1528	<i>pACT2::palH(349-760)</i>	O.Vincent
1532	<i>pACT2::palC</i>	Este trabajo
1543	<i>pACT2::pall(175-549)</i>	Este trabajo
1555	<i>pGBKT7::vps32</i>	O.Vincent
1558	<i>pGBKT7::vps32</i>	Este trabajo
1572	<i>pACT2::vps4 (corregida)</i>	Este trabajo
1581	<i>pACT2::palC</i> ^{R442Δ}	Este trabajo
1582	<i>pACT2::palC</i> ^{R442H}	Este trabajo
1583	<i>pACT2::palC</i> ^{R442A}	Este trabajo
1584	<i>pACT2::palC</i> ^{Y451A}	Este trabajo
1585	<i>pACT2::palC</i> ^{P439F}	Este trabajo
1598	<i>pACT2::palC(1-426)</i>	Este trabajo
1599	<i>pACT2::palC(1-454)</i>	Este trabajo
1608	<i>pRS416::YGR122W</i>	M.Peñalva
1609	<i>pRS416::cDNAPalC</i>	M.Peñalva
1610	<i>pACT2::palB</i>	O.Rodríguez
1614	<i>pACT2::vps20</i>	Este trabajo
1615	<i>Vps4 [Corrección]</i>	Este trabajo
1624	<i>pACT2::vps2</i>	Este trabajo
1625	<i>pACT2::vps24</i>	O.Rodríguez
1626	<i>pACT2::vps25</i>	O.Rodríguez
1630	<i>pGBKT7::vps2</i>	Este trabajo
1631	<i>pGBKT7::vps25</i>	O.Rodríguez
1634	<i>pGBKT7::vps4(corregida)</i>	Este trabajo
1646	<i>pACT2::vps60</i>	Este trabajo
1649	<i>pGBKT7::vps24</i>	O.Rodríguez
1652	<i>pGBKT7::vps60</i>	Este trabajo
1655	<i>pGBKT7::vps20</i>	Este trabajo
1695	<i>pGBKT7::palF</i>	O.Vincent
1708	<i>pGBKT7::palA</i> ¹⁻⁷⁹⁸	Este trabajo
1739	<i>pACT2::palC</i> ^{F15S}	Este trabajo
1740	<i>pACT2::palC</i> ^{I188D}	Este trabajo
1741	<i>pACT2::palC</i> ^{G321D}	Este trabajo

Tabla M.-3: Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *S. cerevisiae*

3.5.3 PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *Escherichia coli*

pGEX2T (p20)

Plásmido comercial de la casa Pharmacia, del cual derivan los plásmidos construidos para la expresión de proteínas fusionadas en su extremo amino-terminal a la Glutación S-Transferasa (GST) (Tabla M.-4).

pQEZZHis (p1603)

Plásmido para la expresión de proteínas fusionadas en el extremo N- terminal al dominio ZZ (una repetición en tándem del dominio de unión a la inmunoglobulina G (IgG), Z, de la proteína A *Staphylococcus aureus*) y con una cola de histidinas en el extremo C-terminal. Los plásmidos derivados del pQEZZHis (Tabla M.-4) utilizados en esta tesis no expresan la cola de histidinas.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	FUENTE
1516	<i>pGEX2T::vps32</i>	O.Vincent
1539	<i>pGEX2T::palA</i> ¹⁻⁷⁹⁸	O.Vincent
1579	<i>pGEX2T::palC</i>	Este trabajo
1623	<i>pQEZZHis::vps60</i>	Este trabajo
1643	<i>pQEZZHis::vps25</i>	Este trabajo
1651	<i>pQEZZHis::vps32</i>	Este trabajo
1662	<i>pQEZZHis::vps20</i>	Este trabajo
1671	<i>pGEX2T::napB</i>	L.Araújo
1672	<i>pQEZZhis::vps4</i>	Este trabajo
1684	<i>pGEX2T::palC</i> ^{R442Δ}	Este trabajo
1685	<i>pGEX2T::palC</i> ^{R442H}	Este trabajo
1686	<i>pGEX2T::palC</i> ^{R442A}	Este trabajo
1687	<i>pGEX2T::palC</i> ^{Y451A}	Este trabajo
1700	<i>pQEZZHis::kapA50</i>	J.Fernández

Tabla M.-4: Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *E. coli*

3.5.4 GENERACIÓN DE CASETES MEDIANTE PCRS DE FUSIÓN

Los fragmentos de DNA utilizados para generar la estirpe MAD2218 (*palCΔ*), o las estirpes que expresan a niveles fisiológicos proteínas fusionadas a GFP en su extremo C-terminal, MAD1373 y MAD2220, fueron obtenidos mediante PCR de fusión, según el protocolo descrito por Yang et al.²²⁹. En la Figura M.-1 se muestra un esquema representativo del proceso seguido para generar los diferentes casetes de transformación, los cuales están compuestos por una región 5' no codificante, de aproximadamente 1 kb del gen diana (el promotor en el caso de que se pretenda deleccionar el gen, o la región 3' de la secuencia codificante del gen cuando lo que se quiere es etiquetar la proteína), y de una región 3' no codificante, del mismo tamaño (terminador) de dicho gen, fusionadas ambas al gen *pyrG* de *A. fumigatus*, que se utilizó como marcador de selección. En todos los casos, cada fragmento de DNA fue amplificado por separado (Figura M.-1), para lo cual se utilizó la polimerasa

Pfu DNA Polimerase (Promega), mientras que para la fusión de los distintos fragmentos se utilizó la polimerasa Prime Star® HS DNA polimerase (Takara). Las condiciones de PCR fueron las indicadas por el fabricante de cada polimerasa, con ligeras variaciones en función de los oligonucleótidos empleados y el tamaño esperado del amplicón.

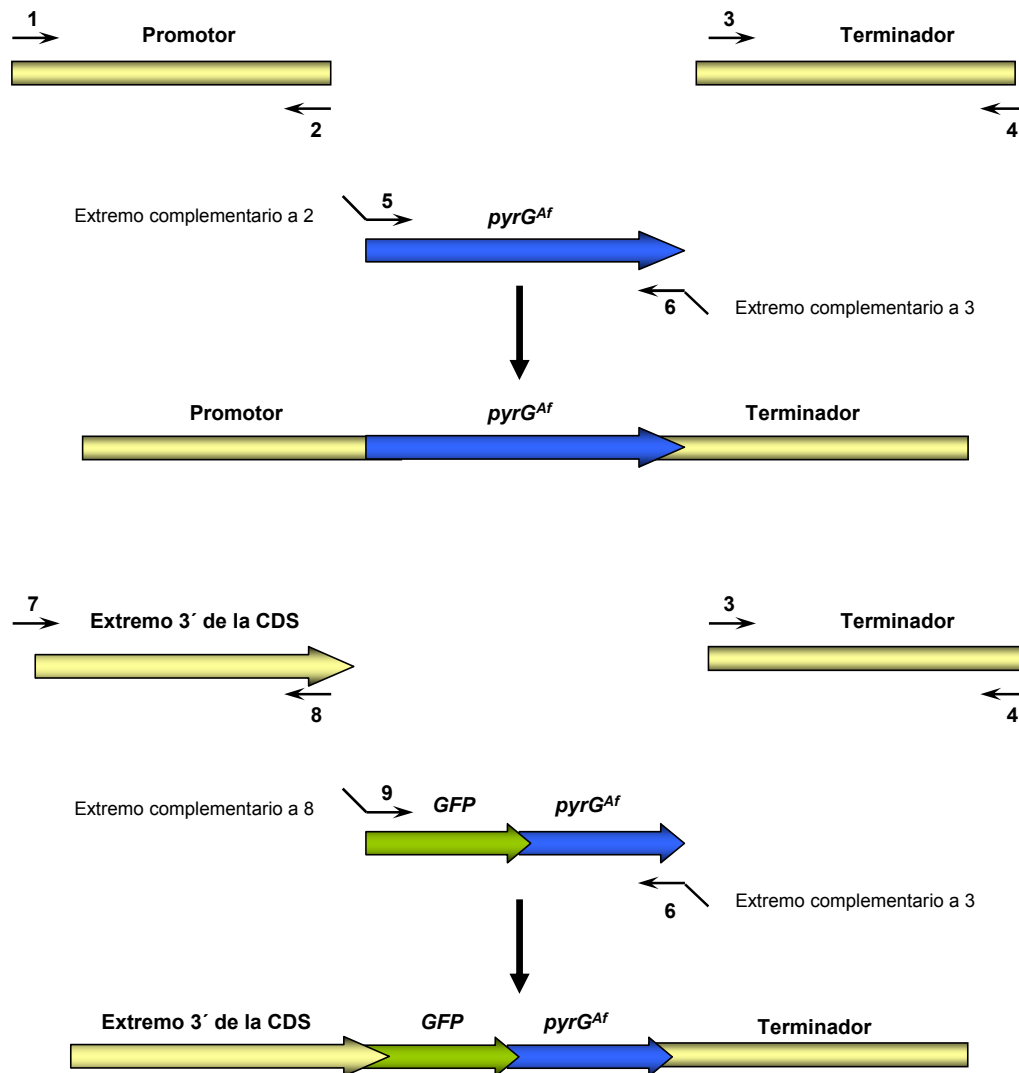


Figura.-M1: Estrategia para generar casetes de transformación mediante PCR de fusión. A) Estrategia para obtener fragmentos de DNA para generar alelos nulos. B) Estrategia para obtener fragmentos de DNA para etiquetar proteínas el extremo C-terminal. Cada uno de los distintos fragmentos es amplificado por separado mediante PCR con una pareja de oligonucleótidos específicos (indicados con números del 1 al 9). El fragmento central, *pyrG^{Ap}* o *GFP::pyrG^{Ap}* se amplificó con una pareja de oligonucleótidos que llevan una región complementaria a los fragmentos flanqueantes con los que se iba a fusionar. Para la unión de los tres fragmentos se añaden a la reacción de PCR los oligonucleótidos de los extremos (1 y 4 en A; 7 y 4 en B).

3.5.5 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos sintéticos se diseñaron con el programa informático Vector NTi 8 y fueron suministrados por Sigma. En la Tabla M.-5 se muestran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

CÓDIGO	NOMBRE	SECUENCIA 5'---3'
8	3PalC3	GCACTTGATAGACTAGGGTAAGG
9	5PalC2	GTAGCCCAACGCGCCGAGC
10	3PalC2	GCTCTTGCGCGGGCAACTAGG
11	5PalC1	GGTGGAGGACTGGCAGTGATG
12	5PalC3	GGTGTGACGAGGACGTTGCC
13	3PalC1	GGAAGGACGGCGTAGAGAGC
14	3PalCGFPA1	GGATCCTGCAGAGCCCGTGTTTCGTAGTC
15	3PalCGFPA2	GGATCCGACTGTTGCGAAGTATGGGGATG
16	5PalCGFPA1	CCAACAATCAACAGGGTCGACTC
17	3PalCGR	GAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
18	5PalCGR1	GGATCCATGTCTTCATCCCCATACTTCGC
19	5PalCGR2	GGATCCATGGGACTACGAAACACGGG
20	3'PallcytM175	GAATTCTTACTTCGCAGAATTGCC
21	5'PallcytM175	CCATGGAGATGCGCCGACTCTGG
23	3' GFP	CCTCGAACTTCACCTCGGCG
25	5' GAL4AD	GTTGGACGGACCAAACTGC
26	5' GFP	TTCAGCCGCTACCCCGACC
27	5' GFP MUTA	CGAGCTGTACAAGGGAGGCGGCCGCCGGC
28	3' GFP MUTA	GCCGGGCGGCCGCCCTTCTTGACAGCTCG
29	5' NOTI PalC	GCGGCCGCATGGTCTACCCCTTTGAACTCC
30	5' NOTI392 PalC	GCGGCCGCATGGGCGGATTAGGGCCTGGG
31	5' NOTI 446 PalC	GCGGCCGCATGCTTCCACCTCAGCCTCCATATAC
32	5' GFP MUTA II	CGAGCTGTACAAGGGAAGCGGCCGCCGGC
33	3'427 EcoRI PalC	GAATTCATTGCGTATTCAGTGTATCATTAGC
34	3'456 EcoRI PalC	GAATTCAGGCGGGGTATATGGAGG
35	1(1-454)EcoRI	GAATTCAGGCGGGGTATATGG
36	3(1-426)EcoRI	GAATTCATTGCGTATTCAGTGTATCATTAGC
37	2(1-454)BamHI	GGATCCTCAAGGCGGGGTATATGG
38	4(446-507)	CCACCTCAGCCTCCATATACCCCG
39	3' PalC[P439F]	GACATCACGGCCAGAGAAGAGGTTGGCGACATAG
40	5' PalC [P439F]	CTATGTCGCCAACCTCTTCTCTGGCCGTGATGTC
41	3' PalC[R442H]	GGTGGAAGGACATCATGGCCAGAGGGGAGG
42	5' PalC[R442H]	CCTCCCCTCTGGCCATGATGTCCTTCCACC
43	NotI PalC(446)	GCGGCCGCCACCTCAGCCTCCATATACCCCG
44	5' PalC[R442del]	CCTCCCCTCTGGCGATGTCCTTCCACC
45	3' PalC[R442del]	GGTGGAAGGACATCGCCAGAGGGGAGG
46	3' PalC[R442A]	GGTGGAAGGACATCACGGCCAGAGGGGAGG
47	5' PalC[R442A]	CCTCCCCTCTGGCGCTGATGTCCTTCCACC
48	5' PalC[Y451A]	CCACCTCAGCCTCCAGCTACCCCGCCTTCTC
49	3' PalC[Y451A]	GAGAAGGCGGGGTAGCTGGAGGCTGAGGTGG
50	5' Vps20 1	ACAATGGGGAATACGAACAGC

51	3' Vps20 1	TCAGGAAGCGGGAATCG
52	B(1-454)BamHI	GGATCCAGGCGGGGTATATGGAGG
53	5' STOP GFP446	GACGAGCTGTACAAGGAAGGCGGCCGCCACCTC
54	3' STOP GFP446	GAGGTGGGCGGCCGCCTTCCTTGTACAGCTCGTC
55	5' 454G	CCATATACCCCGCTGGATCCCCCATGGTG
56	3'454G	CACCATGGGGGATCCAGGCGGGGTATATGG
57	3'Vps20	GAATTCAGGAAGCGGGAATCGC
58	5'Vps20	CCATGGGGAATACGAACAGCTC
59	3'[E204K] Vps4	CTCTCACCCATCCATTTGAACTAAATCACTGC
60	5'[E204K] Vps4	GCAGTGATTTAGTTTCGAAATGGATGGGTGAGAG
61	5'BamHI Vps60	AAAGGATCCATGAATCGATTATTTGGCAGC
62	3'EcoRI Vps60	AAAGAATTCAGCCCAACCCGGTAGC
63	5'BamHI Vps20	AAAGGATCCATGGGGAATACGAACAGCTCTC
64	3'EcoRI Vps20	AAAGAATTCAGGAAGCGGGAATCGC
65	5'NcoI Vps32	AAACCATGGTATGTGGTCATGGTTCGGTGG
66	3'BamHI Vps32	AAAGGATCCTCACATGGCCATTTCCGC
67	5'NcoI Vps4	AAACCATGGGTATGAGCAATACCGACTTCCTTGG
68	3'BamHI Vps4	AAAGGATCCTAAGCACCCCTCACTTCCGAAC
69	5'NcoI Vps60	AAACCATGGGTATGAATCGATTATTTGGCAGGAAG
70	3'BamHI Vps60	AAAGGATCCTCAGCCCAACCCGGTAGC
71	5'BamHIYGR122w	AAAGGATCCATGCGTGAGAATGCAATGTC
72	3'EcoRIYGR122w	AAAGAATTCAAAAATAATTACCGCAATTGTG
73	3'YRG122W	GACGCTTGTGAAGATTGATAAGC
74	5'BamHI Vps4	AAAGGATCCATGAGCAATACCGACTTCCTTGG
75	5'MutaVps32	GGGCATGCCCATGGGTATGTGGTCATGGTTCCG
76	3'MutaVps32	CGAACCATGACCACATACCCATGGGCATGCCC
77	3'EcoRI Vps4	AAAGAATTCTAAGCACCCCTCACTTCC
78	5'BamHI Vps2	AAAGGATCCATGAATATCGTCGTGCAATGGGC
79	3'EcoRI Vps2	AAAGAATTCCTTATCGTCTGAGACTGTCAAGCC
80	5'BamHI Vps25	AAAGGATCCATGGCGGCAACTATCCCC
81	3'EcoRI Vps25	AAAGAATTCCTTATCGTCTGAGACTGTCAAGCC
85	5'HindIII/HA	AAAAAGCTTAGATCTGTATGGCTTACCC
86	3'EcoRI-Vps32	AAAGAATTCGATCCTCACATG
87	EcoRI PalCdown	AAAGGATCCAATAGTAAGCATTATCGGCCC
88	BamHI PalC Up	AAAGGATCCATGGTCTACCCCTTTGAACTCC
89	EcoRI PalCdown	AAAGAATTCAATAGTAAGCATTATCGGCCC
90	3'HisECORI20	AAAGAATTCTCGGAAGCGGGAATCGCAG
92	3'HisEcoRI32	AAAGAATTCACATGGCCATTTCCGCGC
93	3'HisEcoRI didB	AAAGAATTCTCGTTTGCGGCCCGTAGG
97	GSP4-Vps32	TGACCATGATTAAGCTACGCC
101	3' HindIII-mRFP	AAAAAGCTTCGGCGCCGGTGGAGTGGC
102	5'HindIII-mRFP	AAAAAGCTTGTCGCCCTCCTCCGAGG
129	5'HindIII GA	AAGCTTGGAGCTGGTGCAGGCGC
130	3' PalC[F15S]	GAGAGGGCAGATTGAGAAGAGAGGTGAGAAGTTG
131	5' PalC[F15S]	CAACTTCTCACCTCTCTTCTCAATCTGCCCTCTC
132	3' PalC[G321D]	CGTCCGCATCTACGTGAAAAACCGGCATGC
133	5' PalC[G321D]	GCATGCCGGTTTTTCGACGTAGATGCGGACG
134	3' PalC[l188D]	GAAGACAGGAACGAATGGTCGGTGCTCGCTTGTAGGAGAG
135	5' PalC[l188D]	CTCTCTACAAGCGAGCACCGACCATTCGTTCTGTCTTC

MATERIALES Y MÉTODOS

136	5'NcoI-PalC	CCATGGTCTACCCCTTTGAAC
137	3'HindIII-PalC	AAGCTTATAGTAAGCATTATCGGCCCG
138	3'EcoRI-mRFP	GAATTCTTAGCGCCGGTGGAGTG
181	PalC3UTR5'	TATCCAAATTTGGTCTTGTGTATCCCTTACC
182	PalC3UTR3'	GTTAAGCCAGCCGTATCCTC
183	PalC5UTR5'	GCGTTGCGACCGCAGCTACG
184	PalC5UTR3'	GGTGACGAATGTGTAGTCTTGGGTGGTTGTAG
185	PalC3'pyro	GGTAAGGGATACACAAGACCAAATTTGGATAGCGAGTGTCTACATAATGAAGGACAAATGC
186	PalC5'pyro	CTACAACCACCCAAGACTACACATTCGTCACCGGACATCAGATGCTGGATTACTAAGGTAATG
188	3'GFPos-EcoRI	AAAGAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
189	5'osmani GFP	TGAAGGTGATGCAACATACGG
190	5'NcoIPalC	AAACCATGGTCTACCCCTTTGAACTCC
5/Miguel (78)	Edu reverse	AGCTATGACCATGATTACGCC
6/Miguel (77)	Edu forward	TTGTAAAACGACGGCCAGTG
AM17	AM17 - 5' pyrG fum	GAAGATCTATACAAATAAACCGGTGCGCTCAAAC
AM18	AM18 - 3' pyrG fum	CAGATCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG
AM110	AM110	CAGACTACACATTCGTTACAA
B4-1	5'PalCGA5	GTTTCCAGGGCGGGCCGATAATGCTTACTATGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCC
B4-2	3'PalCpyrG1	ATAGTAAGCATTATCGGCCCGCCC
B4-3	3'MUTA ALA	CCTGCACCAGCTCCAGCGGCAGCATTATCGGCCCG
B4-4	3'DeltaTyr	CTGCACCAGCTCCAGCATTATCGGCC
B4-5	3'PalA-EcoRI	AAAGAATTCTGAGAACTTCATCCCTTTCG
B4-6	3'Che-EcoRI	GAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
B4-7	3'BgIII-PyrG	AGACTCCTGTCTGAGAGGAGGCACTG
B4-8	5'MUTA ALA	CGGGCCGATAATGCTGCCGCTGGAGCTGGTGCAGG
B4-9	5'MPalA	GAAGTTCTCAGGATCAATCACTAGTGAATTCGG
B4-10	3'MPalA	CCGAATTCAGTAGTGATTGATCCTGAGAACTTC
B4-11	5'GA-EcoRI	AAAGAATTCGGAGCTGGTGCAGGCGCTG
B4-12	5'Deltatyr	GGCCGATAATGCTGGAGCTGGTGCAG
B4-13	5'cDNAPalA-NcoI	AAACCATGGCCTCAAATATCCTCCAG
B4-14	5'cDNAPalA-BgIII	AAAAGATCTATGGCCTCAAATATCCTCCAG
B4-15	3'PyrGfum-BgIII	AAAAGATCTCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATG
B4-16	3'cDNAPalA-EcoRI	AAAGAATTCATGAGAACTTCATCCCTTCG
Pales 1	HR1	TCGTGAATGTCTAGTGCCGCAC
Pales 2	HF1	GTCTTACCCATCTGCCTCCTCG
Pales 3	APROM	CTATGGAGCTGGTGCAGTTCG
Pales 4	AS1	CGCATCTACGTGCAAGGCAGTTC
Pales 5	Pall up	CCCTCACTTCCGAACTACTTGTA
Pales 6	Pall down	ATTATCTGAGAACTTCATCCCTTCG
Pales 7	PalFdown	AGGACATCGCCAGAGGGG
Pales 8	ADH6	CGGGCTCTTAAC TAGGCGGCG
Pales 9	ADH2	GGAATACGACCATGGACAGCTC
OR	5'NcoI didB	AAACCATGGTTCGGAAGGATCCC
OV118	OV118	GGGCTGCAAGCCACGTTTGGTG
OV15	OV15	CGATGAAGATAACCCACC
OV166	OV166	CAGAAGGTGACACGAAGGTCG
-	sla4	CCTCCTTGATGGCTTGAAGTATCCGTTC
-	sla3	ATCACCGGCCCATGAATCCGGAGTAGTGGT
-	sla2GFP2	CGCATCAGTGCTCCTCTCAGACATCACCGGCCCATGAATCCGGAGTAGTGGT

-	sla2GFP1	GAAATGCGCAAGATTTCTATCAGGAGGATGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC
-	sla2	GAAATGCGCAAGATTTCTATCAGGAGGAT
-	sla1	ATATACCAAGAATAACGAGATGCGAAACGG
-	rojaup	AGCTGAAGGTGACCAAGG
-	rojaDW2	GTTGTGGGAGGTGATGTCC
-	RFP2	CCAAAGAGACCAAAGCACCAGGACCACTCGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG
-	RFP1	GGAGAAGTTACGCGCGGAAATGGCCATGGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCG
-	pgpDup	GGCAGTCGACCCATCCGG
-	pgpdup	TCGACCCATCCGG
-	PalCSP4 Miguel	CTCCCTCAAGCTCACCCTGCTCAACATCG
-	PalCSP3 Miguel	CTTGTGTATCCCTTACCCTAGTCTATCAAGTGCGG
-	PalCSP2 Miguel	ATAGTAAGCATTATCGGCCCGCCCTGGAAACGC
-	GSP4-PalC	GCTGCCAGAGAACGTGGCGATGTGGAGGG
-	GSP1-PalC	CGTTGGTGGTTGTTTGTGATCTGGTGTGG
-	gpdaTdw	AAACTAGTCAATAGTGGTGAAATTGATCG

Tabla M.-5 Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis

3.6 MANEJO DE *Aspergillus nidulans*

3.6.1 MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE ESTIRPES

El medio MCA sólido (véase Material y Métodos, apartado 3.1.1.), con los requerimientos necesarios, se utilizó para el mantenimiento vegetativo de las cepas y la obtención de conidiosporas. Los conidios se recolectaron rascando la superficie de las colonias con una espátula estéril y se resuspendieron en una solución acuosa de TWEEN 80 al 0,01% (v/v).

3.6.2 TRANSFORMACIÓN DE *Aspergillus nidulans*

La transformación en *Aspergillus* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tilburn et al.²³⁰. Se inocularon 2×10^6 conidiosporas en 400 ml de medio mínimo, con los requerimientos necesarios para cada cepa, y con tartrato amónico 5 mM y D-glucosa al 1% (p/v) como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. El cultivo se incubó durante 16-18 horas a 30°C, el micelio se recolectó por filtración a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25 μ m, Calbiochem 475855) y se lavó con agua destilada estéril. Se resuspendió ~1 g de micelio en 20 ml de tampón de protoplastos (MgSO₄ 1.2 M, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 5,8) frío y estéril. El tratamiento para destruir la pared celular se realizó con la mezcla de enzimas Glucanex (Novo Nordisk. Ref. CH-4243). Se utilizaron 150 mg de Glucanex por cada gramo de micelio. La suspensión se preincubó durante 5

minutos a 0°C, pasados los cuales se incubó a 30°C con agitación suave durante 1 a 2 horas. Tras este período de incubación a 30°C, se comprobó la formación de protoplastos mediante observación al microscopio óptico.

Una vez formados los protoplastos, se agitó la suspensión de los mismos durante unos segundos en el vórtex para liberar los atrapados por los restos de micelio. Posteriormente, la suspensión (≤ 15 ml) se depositó en tubos Falcon estériles y se cubrió, sin mezclar, con un volumen igual de “Colchón de flotación” (D-Sorbitol 0,6 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 7,5) frío y estéril. Esta mezcla se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 6.000·g (rotor A-4-44, centrífuga eppendorf 5810R). Tras la centrifugación, los protoplastos formaron una banda en la interfase entre el tampón de protoplastos y el colchón de flotación. Los protoplastos se recogieron con una pipeta Pasteur estéril y se diluyeron con 2 volúmenes de Solución ST (D-Sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). La suspensión se centrifugó a 4°C a 4.000·g durante 10 minutos (rotor A-4-44, centrífuga Eppendorf 5810R), se eliminó el sobrenadante por decantación y se lavó el “pellet” de protoplastos con 1 ml de Solución ST, mediante resuspensión y posterior centrifugación a 4°C en un tubo eppendorf a 13.000·g durante 1 minuto. Esta operación se repitió dos veces más utilizando la solución STC (D-Sorbitol 1M; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl_2 10 mM). Tras los lavados, se contó el número de protoplastos utilizando una cámara de Neubauer. Los protoplastos se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en el volumen adecuado de Solución STC para obtener $\sim 5 \times 10^7$ protoplastos/100 μl . A 200 μl de esta suspensión (depositados en un tubo Falcon estéril de 50 ml) se les añadió el DNA transformante (de 1 a 3 μg de DNA) y 50 μl de una solución de polietilenglicol [SPEG: PEG 6000 (Fluka) 60% (p/v); Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl_2 10 mM] Se pipeteó varias veces para homogeneizar la suspensión y se incubó durante 20 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1 ml adicional de SPEG a la mezcla, se homogeneizó y se mantuvo la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 5 ml de Solución STC a cada tubo, la solución se mezcló suavemente, se agregaron 15 ml de “Top agar” [MMA con sacarosa 1 M; glucosa 1% (p/v); tartrato amónico 5 mM y agar 0,4% (p/v)], fundido y atemperado a 48°C, a cada tubo y se mezclaron. Finalmente, se extendieron 5 ml de cada mezcla en placas de medio de regeneración [MMA con sacarosa 1 M; glucosa 1% (p/v); tartrato amónico 5 mM y agar 1% (p/v)] con los requerimientos adecuados. En el caso de las transformaciones en las que se utilizó como marcador de selección la auxotrofia para uracilo y uridina, se empleó como medio de regeneración MCA con sacarosa 1 M; glucosa 1% (p/v); tartrato amónico 5 mM y agar 1% (p/v).

3.6.3 AISLAMIENTO DE DNA.

Se recogieron las conidiosporas de un cuarto de placa de Petri (MCA con los requerimientos apropiados) en 5 ml de TWEEN 80 0,01% (v/v). Se inoculó 1 ml de esta suspensión en 20 ml de MMA con D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono, tartrato amónico 5 mM como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para el crecimiento de la estirpe. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 16 h con una agitación de 250 r.p.m. El micelio se recogió por filtración con Miracloth (muselina con un poro de 22-25 μm , Calbiochem 475855), se congeló inmediatamente en nieve carbónica y se liofilizó durante la noche en un liofilizador Cryodos (Telstar). El micelio liofilizado, depositado en un tubo de tapón de rosca de 2 ml, se trituró con una bola de cerámica de 0,55

cm [procedente del “kit” FastDNA®Kit de BIO 101 (Q-Biogen)] utilizando un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant, con un pulso de 10 segundos a fuerza 4.0. El polvo de micelio obtenido se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8; sacarosa 250 mM y EDTA 20 mM. Seguidamente, se añadió SDS hasta una concentración del 0,1% (v/v) y se incubó el lisado 15 minutos a 65°C. A continuación, se extrajeron las proteínas del lisado (al menos dos veces) mediante partición en fase con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó después de cada extracción para separar la fase acuosa (que se recogió) de la orgánica (que se desechó). Después, se precipitaron los ácidos nucleicos con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 6 y 0,6 volúmenes de isopropanol. El precipitado se recogió mediante centrifugación durante 5 minutos a 16100-g, se lavó con etanol al 80% (v/v), y se secó posteriormente al vacío. El precipitado se resuspendió en agua y se eliminó el RNA por digestión con RNasa A (Roche) libre de DNasa (1 µl de RNasa 5 µg/ml en 100 µl de muestra) durante 60 minutos a 37°C. El DNA se precipitó de nuevo con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 6) y 0,6 volúmenes de isopropanol, y se recogió formando una madeja. Se lavó con etanol al 80% y los restos de etanol se eliminaron secando la muestra al vacío. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de agua y se estimó su concentración aproximada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE *Aspergillus nidulans*

Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron a partir de 200-250 mg de micelio filtrado con Miracloth (muselina con un poro de 22-25 µm, Calbiochem 475855), escurrido, congelado en nieve carbónica y liofilizado. El micelio liofilizado, depositado en un tubo de tapón de rosca de 2 ml, se rompió con un pulso de 10 segundos a fuerza 4.0 en el FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant a 4 °C, utilizando una bola de cerámica de 0,55 cm procedente del kit FastDNA®Kit de BIO 101 (Q-Biogen). A continuación, se añadió 1 ml de tampón A50 [HEPES 25 mM pH 7,5; KCl 50 mM; Mg Cl₂ 5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10% (v/v); 0,5 mM ditiotreitól (DTT); 1 µM pepstatina (Roche); 0,6 µM leupeptina (Roche) y 1 mM Pefablock (Roche)] y se resuspendió el polvo de micelio mediante agitación en rueda giratoria a 4°C durante 1,5 horas. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 16100-g, a 4°C, durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford²³¹. Previamente, se realizó una recta patrón, utilizando concentraciones conocidas (rango de valores entre 1 y 10 µg/µl, ambos incluidos) de lisozima (Sigma) por triplicado, para obtener la ecuación de la recta.

Para la preparación de los extractos proteicos de las estirpes que expresan Pala::GFP se modificó ligeramente el protocolo anterior. El tampón A50*, que se empleó para la preparación de estos extractos, contenía: HEPES 25 mM pH 7,5; KCl 50 mM; Mg Cl₂ 5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10% (v/v); 0,5 mM ditiotreitól (DTT); 5 µM pepstatina (Roche); 3 µM leupeptina (Roche); 5 mM Pefablock (Roche); 2 µM MG132 (Peptide institute) y 0,5% Triton X-100. El micelio liofilizado se rompió también con un pulso de 10 segundos a fuerza 4.0 en el Fast Prep Cell Disruptor, utilizando una bola de cerámica de 0,55 cm, y se resuspendió en un 1 ml de tampón A50*. A la suspensión se añadieron 0,3 g de bolas de vidrio de un diámetro de 0,45 a 0,65 mm

(Sartorius) y se sometió a un nuevo pulso de 10 segundos a fuerza 4.0 en el Fast Prep Cell Disruptor. Esta operación se repitió durante dos veces más, con un minuto de incubación en hielo de las muestras entre cada pulso para evitar su calentamiento. Tras los pulsos en el Fast Prep Cell Disruptor, las muestras se centrifugaron a 16100-g, a 4°C, durante 30 minutos y, al igual que en el protocolo convencional, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración mediante el método de Bradford. Previamente, se había comprobado que la concentración de Triton X-100 contenida en el tampón A50* no alteraba los valores del Bradford.

Para los ensayos de western-blot, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v). Los restos de TCA de los precipitados se eliminaron mediante lavados sucesivos con mezclas de etanol/eter 1:1 y 1:3. Los precipitados se resuspendieron en tampón de ruptura [“Laemmli Buffer”: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% dodecil sulfato sódico (SDS); 5% β-mercaptoetanol; 6 M urea y 0,05% azul de bromofenol]²³² y se incubaron durante 5 minutos a 100°C. A no ser que se indique lo contrario, 50 µg de proteína se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% con 0.1% SDS, antes de electrotransferirlos a membranas de nitrocelulosa.

3.6.5. CULTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS BAJO EL CONTROL DE SU PROPIO PROMOTOR O DEL PROMOTOR DE *gpdA*

Para la detección de las proteínas que se expresaron bajo el control de su propio promotor, se utilizó el medio MFA “neutro” tamponado a pH 7 con 50 mM NaH₂PO₄ y 50 mM Na₂HPO₄ al que se le añadió NaCl 50 mM además de la sacarosa al 3%, 5 mM tartrato amónico y los requerimientos de cada estirpe. Las estirpes se cultivaron en 50 ml de este medio durante 16 horas a 37°C con agitación orbital (250 r.p.m.).

Como se ha comentado anteriormente, para los experimentos de cambio de pH, el medio MFA se tamponó a un pH inicial de 4,5 con 50 mM citrato de sodio, pH 3,5 (ácido cítrico 1 M ajustado con NaOH a pH 3,5). Las estirpes se cultivaron en 200 ml de este medio durante 16 horas a 37°C con agitación orbital (250 r.p.m.). A continuación, se recogió el micelio por filtración a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25 µm, Calbiochem 475855) (pH final 4,2-4,3). Una quinta parte del micelio se congeló en nieve carbónica (muestra a tiempo inicial). El resto se transfirió a 200 ml de MFA con los mismos requerimientos, atemperado y tamponado a pH 8,4 con HEPES 100 mM y NaOH. Se recolectaron muestras de 50 ml a distintos tiempos tras el cambio de medio, se separó el micelio por filtración a través de Miracloth, se prensó el micelio con servilletas de papel, se congeló en nieve carbónica y se liofilizó para la extracción de proteínas.

3.6.6 CULTIVOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA (*alcA^p*).

Para detectar la expresión de proteínas bajo el control del promotor *alcA^p*, las estirpes se cultivaron en 400 ml de MMA con D-glucosa al 0,05% (p/v) como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y 25 mM NaH₂PO₄, durante 16 horas a 30°C. Se recogió el micelio por filtración a través de Miracloth. El micelio se dividió en dos partes equivalentes. Una de las partes se transfirió a 200 ml de MMA con D-glucosa

al 3% (p/v) como fuente de carbono, condiciones en las cuales el promotor de *alcA* está reprimido, la otra parte se transfirió a 200 ml de MMA con etanol al 1% (v/v), condiciones de inducción para el promotor de *alcA*. En ambos medios la concentración de tartrato amónico fue de 5 mM, la de NaH_2PO_4 se mantuvo a 25 mM y se añadieron los requerimientos necesarios para el crecimiento de cada estirpe. Al cabo de tres horas adicionales de incubación a 30°C al nuevo medio, el micelio se recogió por filtración a través de Miracloth, se congeló en nieve carbónica y se liofilizó para la extracción de proteínas.

El MMA con una concentración de 25 mM NaH_2PO_4 se corresponde con el medio WMA H^+ empleado en la observación microscópica (*vide infra*) de las distintas estirpes, de manera que esto permite correlacionar las proteínas que se detectan en los ensayos de western-blot con las observaciones al microscopio de la sobreexpresión de proteínas fluorescentes bajo el control del promotor *alcA*.

3.6.7 OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES CON TRANSGENES INTEGRADOS EN LOS LOCI *argB* O *pyroA*

Los plásmidos empleados para la integración de un transgén en *argB* fueron derivados de p1145 y p1444, y las estirpes receptoras fueron MAD1112 y MAD1117. Para transformar estas estirpes se empleó la forma covalentemente circular del DNA plasmídico, por lo que se precisó un único suceso recombinatorio para integrar el transgén presente en los distintos plásmidos en el locus *argB* y restaurar así la prototrofia para arginina (véase Resultados, Capítulo I, Figura R.-15). Las estirpes MAD1112 y MAD1117 llevan el alelo mutante *argB2* y son auxótrofas para arginina, mientras que los plásmidos empleados en estas transformaciones tienen una copia mutada en un sitio único BglII del gen *argB*. La presencia de las dos mutaciones en *argB* deja una ventana de recombinación de unas 150 pb para obtener un gen silvestre. Los transformantes se seleccionaron en placas MMA de regeneración con sacarosa 1 M estabilizador osmótico, glucosa 1% (p/v) como fuente de carbono, tartrato amónico 5 mM como fuente de nitrógeno y en ausencia de arginina. Los transformantes obtenidos se purificaron estriando conidiosporas en medio sin arginina para evitar la heterocariosis. La identificación de los transformantes con integración única del transgén en el locus *argB* se realizó mediante digestión total del DNA genómico procedente de cada transformante con la enzima BamHI. Los DNAs así digeridos se analizaron mediante Southern-blot con una sonda radioactiva (marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP), que contenía el DNA genómico de *argB*.

En el caso de la integración de transgenes en el locus *pyroA*, los plásmidos empleados derivaron del p1660 o del p1712, y las estirpes receptoras fueron MAD1046 o MAD1741. En este caso, los plásmidos tienen una copia truncada de *pyroA*, mientras que las estirpes indicadas, auxótrofas para piridoxina, llevan el alelo *pyroA4*. Al igual que la integración en *argB*, se necesita un único suceso de recombinación para integrar el transgén en el locus *pyroA*. La selección de transformantes se hizo en placas de medio de regeneración de protoplastos sin piridoxina. Se siguió el mismo protocolo que en el caso de las integraciones en *argB* para seleccionar los transformantes con integración única del transgén en *pyroA*, pero el análisis por Southern-blot se llevó a cabo con una sonda radioactiva que contenía el DNA genómico de *pyroA*.

3.6.8 OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES CON UN TRANSGÉN INTEGRADO EN EL LOCUS *vps32*

El plásmido empleado en este caso fue p1721 y la estirpe receptora fue MAD1921. Esta estirpe tiene el alelo mutante *pyrG89*, y por tanto es auxótrofa para uracilo y uridina. El plásmido p1721 contiene una construcción formada por el promotor de *vps32* (~600pb UTR), la secuencia codificante de *vps32* y la secuencia de la mRFP (monomeric Red Fluorescent Protein) junto con el promotor y la secuencia codificante del gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*, que complementa la mutación *pyrG89*. Mediante un único suceso de recombinación homóloga se produciría la integración del transgén *vps32^p::vps32::mRFP* junto al gen *pyrG^{Af}* en el locus *vps32*, por lo que los transformantes son protótrofos para uracilo y uridina. Los transformantes se seleccionaron en placas MCA de regeneración con sacarosa 1 M como estabilizador osmótico. Los DNAs de estos transformantes se digirieron con EcoRI y se analizaron mediante Southern-blot con una sonda radioactiva que contenía parte del DNA genómico de Vps32. La hibridación con esta sonda resultó en una única banda de ~3,8 kb en la estirpe receptora y dos bandas, de ~5,3 y ~2,7 kb en los transformantes (véase Resultados, Capítulo I, Figura R.-32).

3.6.9 OBTENCIÓN DE ALELOS MUTANTES EN *palC*

Para asegurar el reemplazamiento del gen *palC* silvestre por los alelos *palC300*, *palC301* y *palC302*, se generó una estirpe en la que se había eliminado la secuencia codificante del gen *palC* por sustitución con la secuencia genómica del gen *pyroA* de *A. fumigatus*, mediante transformación de la estirpe MAD1737, (*pyrG89 pyrA44*), con un fragmento de PCR que contenía el gen *pyroA^{Af}* flanqueado por las regiones 3'UTR y 5'UTR de *palC* (oligonucleótidos Tabla M.-5, códigos 181-186). Mediante esta transformación se obtuvo la estirpe MAD2218.

Los fragmentos de ~3,7 kb resultantes de la digestión de los plásmidos p1851, p1852 y p1856 con NcoI/EcoRI contienen los alelos *palC300*, *palC301* y *palC302* respectivamente, más el gen *pyrG^{Af}* y la región 3'UTR de *palC*. Cada uno de estos fragmentos se utilizó para transformar la cepa MAD2218, para reemplazar el gen *pyroA^{Af}* que ocupaba el locus *palC* (véase Resultados, CapítuloI, Figura R.-2) por la secuencia de cada uno de los alelos *palC* mutantes más el gen *pyrG^{Af}*, mediante un doble sobrecruzamiento: uno en la región codificante de *palC* y otro en la región 3'UTR de *palC* (véase Resultados, CapítuloI, Figura R.-2). De esta manera los nuevos alelos quedaban integrados en el locus de *palC*. Los reemplazantes génicos se seleccionaron en medio mínimo que contenía piridoxina pero carecía de uracilo y uridina, y se analizaron por Southern-blot. En el análisis por Southern-blot, los DNAs de los transformantes se digirieron con NcoI/BamHI, y los fragmentos de *palC* se detectaron con una sonda marcada con [α -³²P] dCTP, que contenía la región 3' de la secuencia codificante de *palC* y parte de su 3'UTR. La hibridación dio lugar a un fragmento de ~ 4,1 kb en la cepa MAD2218, y dos bandas de ~ 1,7 kb y ~ 3,6 kb, en los transformantes que habían reemplazado el gen *pyroA^{Af}* por los alelos *palC300*, *palC301* o *palC302*.

3.6.10 CRUCES ENTRE ESTIRPES DE *Aspergillus*

Para favorecer la anastomosis entre hifas de dos estirpes parentales distintas, los cruces se realizaron mediante inóculos puntuales de ambas estirpes en una misma placa de MCA suplementado con los requerimientos de las dos cepas. Los parentales tenían distintos requerimientos nutricionales e, idealmente, distintos marcadores de color de las esporas para facilitar la identificación de los cleistotecios híbridos. Una vez favorecida la anastomosis (2-3 días de crecimiento a 37°C), se recortaron pequeñas porciones de medio sólido en las zonas donde habían entrado en contacto las hifas de ambos parentales. Estas porciones se traspasaron a placas de MMA selectivo, que permite sólo el crecimiento de los heterocariontes, suplementado con glucosa al 1% como fuente de carbono y tartrato amónico 5 mM y nitrato de sodio 10 mM como fuentes de nitrógeno. Las placas se incubaron a 37°C hasta que se formaron sectores heterocarióticos. Para favorecer la entrada en ciclo sexual, las placas de MMA con los sectores heterocarióticos se sellaron con el fin de conseguir condiciones de anaerobiosis. Los cleistotecios se formaron a los 10-15 días de incubación a 37°C. Estos se recogieron de la placa con una aguja estéril, se depositaron en una placa de agar al 1,5% (p/v) solidificado y se rodaron sobre el agar hasta que se desprendieron las células de Hülle. Posteriormente, cada cleistotecio se introdujo en un tubo eppendorf con 100 µl de agua estéril y se rompió contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Se estrieron 5 µl de esta solución en una placa de MMA selectivo y se cultivaron dos días a 37°C para comprobar si el cleistotecio era híbrido. El genotipo de las ascosporas de los cleistotecios cruzados se analizó en placas de MMA selectivas para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

3.6.11 GENOTIPADO DE ESTIRPES MEDIANTE PCR

En todos los cruces realizados en esta tesis, los epítomos GFP, HA₃ y las mutaciones en los genes *pal* se comprobaron mediante PCR. Las estirpes con el gen candidato etiquetado se identificaron por dar lugar a una banda de amplificación de mayor movilidad que aquellas estirpes en las que el gen carecía del epítipo en cuestión (Tabla M.-6), mientras que la mutaciones en los genes *pal* se confirmaron por secuenciación del DNA. Posteriormente, se confirmó (por western-blot o, según el caso, por microscopía de epifluorescencia) que las cepas seleccionadas expresaban dicho epítipo. El DNA que se utilizó para las PCRs diagnósticas procedía de conidiosporas, recogidas con un palillo estéril directamente de una colonia de la estirpe problema. Las esporas se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml de tapón de rosca con 100 µl de “Breaking Buffer” [2% Triton X-100 (Boehringer); 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8] y 150 mg de esferas de vidrio de 0,45 a 0,65 mm de diámetro. Esta suspensión se incubó a 70°C durante 30 minutos con agitación durante 30 segundos cada 10 minutos con un agitador de mesa. Se añadió a cada tubo 200 µl de Fenol-SEVAG para extraer el DNA mediante agitación continua durante 5 minutos con un agitador de mesa. Para sedimentar las bolas de vidrio, los tubos se centrifugaron a 16.110·g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante (fase acuosa). Se utilizaron 0,5 µl de este sobrenadante como molde para una reacción de PCR que se llevó a cabo en un volumen

final de 20 µl, con una concentración de 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de los correspondientes oligonucleótidos y con 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (purificada tal y como aparece descrito en ²³³). Todas las reacciones de PCR se calentaron durante 2 minutos antes de añadir la DNA polimerasa. Las condiciones de temperatura y ciclos de cada reacción se fijaron según los casos, teniendo en cuenta el tamaño del DNA que se deseaba amplificar y los resultados de la estabilidad del apareamiento de los oligonucleótidos, realizado con el programa informático “Vector NTi 8.0” (Invitrogen Corporation). No obstante, las condiciones de referencias a partir de las cuales se fijaron la condiciones particulares de cada reacción de PCR fueron: 30 ciclos de desnaturalización (30s a 94°C), hibridación (30s a 55°C) y elongación (~ 2 min por kb a 68°C) y un último ciclo de elongación (7min a 68°C).

Tabla M.-6 Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de las estirpes por PCR. En la tabla se indica el alelo mutante que se pretendía genotipar en el caso de las estirpes con mutaciones en los genes *pal* o el alelo silvestres y el alelo que codifica para una proteína etiquetada con algún epitopo, la pareja de oligonucleótidos empleada en la reacción de PCR y el tamaño del amplicón. La secuencia de los oligonucleótidos indicados en esta tabla aparece en la Tabla M.-5: código Pales 5: Pall up; código Pales 6: Pall down; código AM110: AM110; código Pales 7: PalF down; código Pales 3: APROM; código Pales 4: AS1; código 12: 5C3; código 8: 3C3; código 5’NcoI Vps32: 65; código 97 GSP4-Vps32; código Pales 8: ADH6; código Pales 9: ADH2.

ALELO	OLIGONUCLEÓTIDOS*	LONGITUD DEL AMPLICÓN (pb)
<i>palI32</i>	Pall up y Pall down	876
<i>palF15</i>	AM110 y PalF down	2136
<i>palH72</i>	HR1 y HF1	548
<i>palA34</i>	APROM y AS1	845
<i>palC</i>	5C3 y 3C3	741
<i>palC::GFP</i>	5C3 y 3C3	4071
<i>palC::HA</i>	5C3 y 3C3	3341
<i>vps32</i>	5’NcoI Vps32 y GSP4-Vps32	1547
<i>vps32::GFP</i>	5’NcoI Vps32 y GSP4-Vps32	4877
<i>palA</i>	ADH6 y ADH2	462
<i>palA::GFP</i>	ADH6 y ADH2	3792

3.6.12 ANÁLISIS FENOTÍPICOS DE LA RUTA DE pH MEDIANTE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

Estos análisis se realizaron sobre MMA sólido con agar Oxoid, con los requerimientos necesarios, con glucosa 1% (p/v) y tartrato amónico 5 mM como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente. En el caso de las estirpes que expresan transgenes bajo el control del promotor de *alcA*, los análisis fenotípicos se efectuaron por duplicado en medio con glucosa 3% (condiciones de represión de *alcA^p*) y en medio con etanol al 1% y 0,05% (condiciones de represión de *alcA^p*) como fuentes de carbono. Los resultados se evaluaron tras 2 días de crecimiento a 37°C. Salvo que se indique lo contrario, las condiciones en las que se realizaron este tipo de ensayos fueron:

Ensayos de sensibilidad a pH alcalino: El pH del medio se ajustó por adición de 200 mM Na₂HPO₄ (el pH aproximado de este medio fue de 8) o mediante la adición de 100 mM HEPES ajustando el pH a ~ 8,4 con NaOH.

Ensayos a pH ácido: El pH del medio se ajustó por adición de 500 mM NaH₂PO₄ (el pH aproximado de este medio fue de 5) o mediante la adición de 100 mM citrato de sodio ajustando el pH a ~ 4,5 con NaOH.

Ensayo de sensibilidad a molibdato: Se añadieron 5 mg/ml (20 mM) de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) al medio.

Ensayo de sensibilidad a neomicina: Se añadieron 2 mg/ml de sulfato de neomicina (Sigma) al medio.

Ensayo de sensibilidad a litio: Se añadió LiCl 300 mM (Merck) al medio.

El NaH_2PO_4 se añadió al medio a partir de una solución 5M, el Na_2HPO_4 de una solución 2M y el citrato de sodio de una solución 1M.

3.7 MANEJO DE *S. cerevisiae*

3.7.1 TRANSFORMACIÓN DE *S. cerevisiae*

El método empleado para la transformación de *S. cerevisiae* se basa en el protocolo de transformación con acetato de litio (AcLi) ²³⁴. A partir de una colonia aislada en una placa de medio YPDA, se inocularon 5 ml de YPDA líquido y se incubaron a 30°C en agitación (250 r.p.m.) hasta que las células alcanzaron una D.O.₆₀₀ entre 0,8 y 1,1. El cultivo se centrifugó 5 minutos a 400·g, se lavó el pellet con agua estéril y se resuspendió en 0,2 ml de TELiAc (100 mM acetato de litio; 0,1 M Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA). Posteriormente, se añadieron 1-2 µl del plásmido transformante (~ 100 ng/µl de DNA) extraído con el “kit” High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) y 2 µl de DNA carrier (Herring testes carrier DNA, 10 mg/ml, BD bioscience) desnaturalizado tras hervirlo a 100°C durante dos minutos. Tras homogeneizar la mezcla con un agitador de mesa, se añadieron 250 µl de TELiPEG [0,1 M acetato de litio; 0,1 M Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA y PEG 3350 al 50% (p/v)]. Las células se mantuvieron 30 minutos a 30°C con agitación ocasional y, transcurrido ese tiempo, se incubaron a 42°C durante 15 minutos. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación durante 1 minuto a 7.000·g y se resuspendieron en 200 µl de agua estéril. Por último, se plaquearon 50 µl y 150 µl de la suspensión de células en placas de medio SD, que se incubaron durante 3 días a 30°C.

3.7.2 EXTRACTOS PROTEÍCOS DE *S. cerevisiae*

A partir de una colonia aislada en una placa de SD se inocularon 5 ml de SD líquido y se incubaron a 30°C durante 16-18 h en agitación (250 r.p.m.). Estos cultivos se diluyeron en 5 ml SD líquido, de manera de que la D.O.₆₀₀ estuviese en torno a 0,2, y se incubaron a 30°C con agitación (250 r.p.m) hasta que alcanzaron una D.O.₆₀₀ ~ 1. Entonces, se tomó 1 ml de los cultivos cuya D.O.₆₀₀ fuese de 1 y se ajustó el volumen del resto de cultivos que tuviesen una D.O.₆₀₀ en torno a 1 (0,8-1,2) teniendo en cuenta la relación 1ml/D.O.₆₀₀ ~ 1. De esta manera, se aseguró que el número de células en las distintas muestras era el mismo. Se centrifugaron las muestras durante cinco minutos a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa a 16100·g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 µl de buffer de carga [8 M urea; 5 % (p/v); 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mM EDTA; 4% (v/v) β-mercaptoetanol; 0,4 mg/ml azul de bromofenol] y se añadieron 100 mg de bolas de vidrio de

0,45 mm a 0,65 mm de diámetro (Sartorius). Se resuspendieron los pellets mediante agitación durante 30 s y se hirvieron las muestras durante 2 minutos a 100°C. Tras agitar las muestras de nuevo 30 s y hervirlas otra vez a 100 °C durante 2 minutos, se centrifugaron a máxima velocidad en una centrífuga de mesa y se utilizaron de 10 a 20 µl del sobrenadante para su análisis por western-blot.

3.7.3 SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO

Para el estudio de las interacciones proteína-proteína se empleó un sistema de doble híbrido en *S. cerevisiae* basado en la organización modular del factor de transcripción Gal4p²³⁵ [MATCHMAKER Two-Hybrid system 2 de Clontech (K1604-1)]. Las estirpes de *S. cerevisiae* con las que se llevaron a cabo los ensayos de doble híbrido fueron la Y187 y la AH109.

3.7.3.1 Obtención de estirpes con distintas combinaciones de plásmidos

Tanto la estirpe Y187 como AH109 son auxótrofas para leucina y para triptófano. Cuando alguna de estas dos cepas se transforma con los plásmidos del sistema de doble híbrido pACT2 o pGBKT7, los transformantes resultantes son protótrofos para leucina o para triptófano respectivamente, ya que pACT2 expresa la proteína Leu2p, que complementa la mutación *leu 2-112* que portan estas estirpes, mientras que pGBKT7 expresa la proteína Trp1p que complementa la mutación *trp 1-901* de Y187 y AH109. Para obtener transformantes de estas dos estirpes que porten a la vez los plásmidos pACT2 y pGBKT7, o derivados de éstos, se cotransformaron las estirpes en un único experimento de transformación con los plásmidos de interés y se seleccionaron los transformantes en medio SD sin leucina y sin triptófano.

3.7.3.2 Detección cualitativa de la interacción entre dos proteínas

La interacción entre dos proteínas se revela en el caso de la estirpe Y187 mediante la detección de la actividad β-galactosidasa. La interacción entre dos proteínas de interés activa la transcripción del gen reportero *lacZ*, regulado por el promotor de *GAL4*. La detección de la actividad β-galactosidasa se realizó cualitativamente mediante la detección *in situ* en los transformantes del color azul debido a la oxidación y precipitación del indol, que resulta de la hidrólisis del X-Gal, sustrato de la β-galactosidasa. Para ello, se estrieron los transformantes primarios en una placa de medio selectivo (~ 12-15 colonias aisladas por cada combinación). Al cabo de dos días de incubación a 30°C, la biomasa de cada una de las estrías se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Whatman Ref. 10-401-116). Esta membrana se incubó a -80°C para favorecer la rotura de las células y, posteriormente, se incubó a 30°C sobre un trozo de papel Whatman empapado con la mezcla de revelado [0,1% (w/v) X-Gal; Z-buffer (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄) y 0,3 % (v/v) β-

mercaptoetanol]. La eficiencia relativa de cada interacción se estimó de manera cualitativa de acuerdo con el tiempo que tardaba en aparecer el color azul.

La cepa AH109 es auxótrofa, además de para triptófano y leucina, para histidina y adenina. Esta estirpe expresa los genes *HIS3* y *ADE2* que complementan la auxotrofia para histidina y adenina, respectivamente, regulados positivamente por el promotor de *GAL4*. La interacción entre dos proteínas se revela por el crecimiento de los transformantes en medios sin histidina (TSM, triple selection medium: -Trp, -Leu, -His) o sin adenina y sin histidina (QSM, quadruple selection media: -Trp, -Leu, -His, -Ade). Para ello, se estriaron los transformantes primarios en placas de QSM y/o TSM para demostrar la interacción y en placas de SD-Trp-Leu para demostrar la viabilidad de los transformantes. Estas placas se incubaron durante 3-4 días a 30°C, tras los cuales se comprobó el crecimiento o no de los distintos clones. Alternativamente, los ensayos de crecimiento en medio selectivo también se hicieron con inóculos de diluciones seriadas de cultivos saturados de los transformantes; de esta manera se evitaba confundir, en el caso de las interacciones más débiles, el crecimiento de los transformantes en medio selectivo con la biomasa “residual” que se origina al estriar las colonias en la placas.

3.7.3.3 Detección cuantitativa de la actividad β -galactosidasa

Para determinar la eficiencia relativa de las interacciones de doble híbrido, se cuantificó la actividad β -galactosidasa. Los datos obtenidos para cuantificar la actividad β -galactosidasa de cada una de las interacciones corresponden a la media de los resultados obtenidos con cuatro clones independientes de cada transformación, tras haber repetido el experimento por triplicado para cada uno de los clones. Cultivos líquidos de cada uno de los clones, crecidos en medio selectivo SD durante 16 horas a 30°C, se diluyeron hasta alcanzar una D.O.₆₀₀~0,2 en YPDA y se incubaron a 30°C durante 4-5 horas hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0,5 y 0,8. De cada uno de estos cultivos se recogieron 4,5 ml y se repartieron en tres tubos eppendorf con 1,5 ml cada uno. Los tubos se centrifugaron a 16100·g en una centrífuga de mesa durante 30 s, se eliminaron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 1,5 ml de tampón Z (véase Material y Métodos, apartado 3.7.3.1). Las suspensiones celulares se centrifugaron nuevamente 30s a 16100·g, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 300 μ l de tampón Z. Se transfirieron 100 μ l de cada una de estas suspensiones a tubos limpios y se lisaron las células mediante tres choques de frío-calor que consistieron en la incubación durante un minuto en un baño con nieve carbónica y etanol, seguido de un cambio a un baño de agua a 37°C durante un minuto. Tras la lisis se añadió a cada uno de los tubos 700 μ l de tampón Z con β -mercaptoetanol (0,27 ml β -mercaptoetanol/100 ml de tampón Z) y 160 μ l de una solución de 4 mg/ml del sustrato de la β -galactosidasa ONPG (Merck). La hidrólisis del ONPG da lugar a galactosa y orto-nitrofenol, el cual tiene un color amarillo y que se puede determinar por colorimetría. Los tubos fueron incubados a 30°C hasta que la solución se volvió amarilla, o durante un tiempo máximo de 2 horas. Para detener la reacción de hidrólisis del ONPG, se añadieron a cada tubo 400 μ l de 1 M Na₂CO₃. Finalmente, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 16100·g y se recogieron 800 μ l de cada tubo para el análisis colorimétrico. Se determinó la D.O. a una longitud de onda de 420 nm de cada uno de los sobrenadante.

La actividad β -galactosidasa se calculó en unidades Miller²³⁶ que expresan el número de μ moles de ONPG hidrolizados por minuto y en relación al número de células. Para el cálculo de las unidades Miller se empleó la siguiente formula: unidades Miller = $1000 \cdot D.O_{.420} / (t \cdot V \cdot D.O_{.600})$, donde t es el tiempo en minutos de incubación a 30°C de la suspensión de células con el ONPG y V es el volumen del cultivo inicial, que en nuestro caso era de 500 μ l; (se partía de 1,5 ml de cultivo que se centrifugaron y finalmente se resuspendieron en 0,3 ml. De esta suspensión celular que estaba 5 veces más concentrada que el cultivo inicial se emplearon 100 μ l para el ensayo colorimétrico). La $D.O_{.420}$ cuantifica la hidrólisis de ONPG mientras que V en función de la $D.O_{.600}$ del cultivo relaciona la actividad enzimática con el número de células.

3.7.4 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE *ygr122w* Δ

El cDNA de *palC* y la secuencia del gen *YGR122w* se clonaron en el vector pRS416. Los plásmidos resultantes se usaron para transformar la estirpe *ygr122w* Δ BY4742, utilizando como método de selección el crecimiento en medio sin uridina. La sensibilidad a LiCl de la estirpe *ygr122w* Δ BY4742, así como de las distintas estirpes transformantes, se determinó según el crecimiento en placas con YPD con una concentración de 200 mM LiCl. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días.

3.8 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.8.1 ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS: “WESTERN-BLOT”

Las muestras de proteínas resuspendidas en tampón de ruptura (extractos proteicos de *A. nidulans*) o en tampón de carga (extractos proteicos de *S. cerevisiae*) se resolvieron mediante electroforesis en geles de 7% al 12% poliacrilamida (dependiendo del tamaño de la proteína de interés) con 0,1 % SDS, para lo que se utilizó el sistema MiniProtean III de BioRad. Los geles se dejaron polimerizar una hora a temperatura ambiente antes de cargar las muestras. La electroforesis se realizó fijando el amperaje a 15 mA/gel hasta que las muestras penetraron en el gel separador, momento en el cual el amperaje se subió a 25 mA/gel. El protocolo de western-blot utilizado fue el descrito por Hervás et al.¹⁴⁶. Las proteínas se revelaron, según el caso, con un anticuerpo monoclonal de ratón α -cMyc (9E10, Santa Cruz Biotechnology), con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón α -GFP (clones 7.1 y 13.1, Roche), con un anticuerpo monoclonal de rata α -HA (3F10, Roche) o con un anticuerpo de conejo α -mRFRp (R1310 Pab Rbx USBiological) (Tabla M.-7). Para los controles de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón α -actina (clon C4, ICN Biomedicals Inc.). Los anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano que se usaron fueron, según el caso, un anticuerpo de cabra contra inmunoglobulina IgG de ratón (H & L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o contra inmunoglobulinas de rata (3010-05, Southern Biotech) (Tabla M.-7). La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema de

quimioluminiscencia ECL (Amersham) (siguiendo las instrucciones del fabricante) y por exposición a películas Kodak X-OMAT.

	ANTICUERPOS	DILUCIÓN	FUENTE	REFERENCIA
PRIMARIOS	α -myc	1/1000	ratón	9E10, Santa Cruz Biotechnology
	α -HA	1/1000	rata	3F10, Roche
	α -GFP	1/5000	ratón	clones 7,1 y 13,1, Roche
	α -mRFP	1/1000	conejo	R1310 Pab Rbx USBiological
	α -actina	1/80000	ratón	clon C4, ICN Biomedicals Inc.
SECUNDARIOS	α -mouse IgG	1/4000	oveja	NA931, Amersham Biosciences
Conjugados	α -rat IgM + IgG	1/4000	cabra	3010-05, Southern Biotech
a peroxidasa	α -rabbit IgG	1/10000	asno	NA934, Amersham Biosciences

Tabla M.-7: Lista de anticuerpos utilizados en esta Tesis

3.8.2 CLONAJE DE CDNA DE *A. nidulans*

Para el clonaje del DNA codificante de *A. nidulans* se emplearon dos métodos distintos. Por un lado, se empleó como fuente de cDNA una genoteca primaria de cDNA clonada en el fagémido λ TriplEx2 (SMARTTM Clontech)²³⁷. Mediante PCR con oligonucleótidos específicos o, según los casos, con oligonucleótidos específicos en combinación con oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonaje del inserto en el vector λ TriplEx2, se logró amplificar y clonar algunos de los cDNAs de interés. En la reacción de PCR se utilizó 1 μ l de la solución de la genoteca primaria, preparada según el protocolo de la casa comercial, en un volumen final de 50 μ l. En dicha reacción de PCR se utilizó la polimerasa *Pfu* DNA Polymerase de Promega, o la polimerasa AmpliTaq[®] de Amersham. En los casos en los no se pudo amplificar el cDNA usando la genoteca primaria, se sintetizó cDNA con el “kit” “AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit” de Invitrogen. La primera hebra se obtuvo usando como molde para la reacción 0,5 μ g de una preparación de RNA total de una cepa silvestre y como cebador el oligonucleótido Oligo-(dT) del kit en las condiciones indicadas por el fabricante. La amplificación del cDNA específico para cada gen se realizó mediante PCR con oligonucleótidos adecuados (Tabla M.-5), utilizando como molde 2 μ l de la reacción de síntesis de cDNA en un volumen final de 50 μ l y la polimerasa *Pfu* DNA Polymerase de Promega. Las condiciones de PCR fueron las indicadas por el fabricante de la polimerasa, con ligeras variaciones en función de los cebadores empleados y del tamaño del cDNA a amplificar.

En el caso del clonaje de los cDNAs codificantes de las “ESCRT-III like proteins” se amplificaron los cDNAs directamente con los sitios de restricción BamHI/EcoRI o NcoI/EcoRI para su clonaje sistemático en los vectores de doble híbrido y de expresión de *E. coli*.

3.8.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*.

La expresión de proteínas de fusión se llevó a cabo en la cepa DH1 de *E. coli* transformada con el plásmido de expresión adecuado (variantes de pGEX-2T y pQE80zz). Se cultivó la bacteria en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, a 37°C durante 16 horas. Se diluyó el precultivo 50 veces en un volumen final de 50 ml de LB más ampicilina (100µg/ml) ($D.O_{600} \sim 0,1$), y se incubó en agitación a 30°C hasta que el cultivo alcanzó una $D.O_{600} \sim$ de 0,7-0,8 unidades. En ese momento el cultivo se cambió a 20°C y se incubó durante una hora para atemperarlo, antes de añadir IPTG a una concentración de 0,1 mM. El cultivo se incubó a 20°C durante 24 horas adicionales. Tras ello, el cultivo se centrifugó a 16000·g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de BB50 (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM $MgCl_2$) al que se había añadido el cóctel de inhibidores de proteasas Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics; 1 pastilla/ 50 ml). Las células fueron lisadas utilizando una French Press (French Pressure Cell Press, American Instrument Company). Los lisados se centrifugaron a 20000·g durante 15 minutos a 4°C (centrifuga Sorvall RC-5B, rotor Sorvall SS-34) para eliminar los restos celulares y el material insoluble. Finalmente, las proteínas se visualizaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida teñido con Coomassie G250 (Bio-Safe, Bio-Rad).

3.8.4. ENSAYOS DE PULL-DOWN

3.8.4.1 Marcaje de proteínas con ^{35}S -Met

El marcaje radiactivo con ^{35}S -Met de la proteína Vps32, que se utilizó como “presa” en los ensayos de pull-down, se realizó mediante síntesis *in vitro*. Para la síntesis, se utilizó el “kit” “TNT[®] Coupled Transcription-Translation System” de Promega (L4610). En cada reacción de síntesis se emplearon: 7,5 µl del plásmido p1555 (Tabla M.-4) a una concentración de 1µg/µl, que codifica para Vps32 bajo el control del promotor T7; 1 µl de inhibidor de RNAsas (RNasin[®]) 40 u/µl; 0,5 µl de mezcla de aminoácidos sin Met 1mM, 0,5 µl de RNA polimerasa de T7 (Poly T7 TNT[®]); 20 µCi ^{35}S -Met 10mCi/ml (“Amersham Biosciences Redivue L-[35S]methionine”, Amersham Biosciences Cat.# AG1094), 12,5 µl de lisado de reticulocitos de conejo TNT[®] y 1 µl de buffer de reacción TNT[®]. La reacción se incubó durante 1 h 30 min a 30°C. Para detectar los productos de la reacción marcados con ^{35}S se analizó 1 µl de la mezcla de reacción en un gel de poliacrilamida al 10% con 0,1% de SDS, se fijó el gel, se secó y se detectó la señal del isótopo ^{35}S por exposición a películas Kodak X-OMAT (730-3216) con una pantalla amplificadora Kodak[™] BioMax[®] TranScreen LE, 20.3 X 25.4 CM (8x10 in.) (1622034001EA).

3.8.4.2 Ensayos de pull-down con extractos de *E. coli* y proteínas marcadas con ^{35}S -Met

La resina de glutatión-Sepharosa (Glutathione Sepharose 4B, Amersham Biosciences) se preparó según las condiciones indicadas por el fabricante y se equilibró al 50% con tampón BB50 (véase Material y Métodos, apartado 3.8.4.1). La fracción soluble de un extracto proteico de *E. coli* que expresaba GST::Pala¹⁻⁷⁹⁸ se cromatografió en una columna de glutatión-Sepharosa (~ 10 µl de resina por cada 20 ml de cultivo). A

continuación, se mezclaron 5 µl de resina cargada con la proteína de fusión y 5 µl de proteína presa marcada con ^{35}S -Met (*vide supra*) en 500 µl de tampón de unión I [10 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 5 mM DTT; 1% Triton X-100 (v/v) y cóctel inhibidor de proteasas “Complete EDTA-free” de Roche (1 pastilla/50 ml)] en tubo de 1,5 ml. La mezcla se incubó durante 1 hora en agitación a 4°C. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron 1 minuto a 100·g, se retiró el sobrenadante, con cuidado de no levantar el sedimento de bolas de Sepharosa, y se lavó con 1 ml de tampón de unión I. Este proceso de lavado se repitió 6 veces. La última centrifugación se realizó a 16100·g, se retiró todo el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 µl de tampón de ruptura ²³². Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 100°C para liberar las proteínas de las bolas de Sepharosa y se resolvieron mediante electroforesis en geles de 10% poliacrilamida con 0,1 % SDS. El gel de poliacrilamida se tiñó con Coomassie G250 (Bio-Safe, Bio-Rad) para visualizar las proteínas unidas a la resina, se secó y se detectaron las proteínas marcadas con ^{35}S por exposición a películas Kodak X-OMAT con una pantalla amplificadora Kodak™ BioMax® TranScreen LE (*vide supra*).

3.8.4.3 Ensayos de pull-down con extractos de *E. coli*

La fracción soluble de extractos proteicos de *E. coli* (sobrenadante de 20000·g; *vide supra*) que expresaban proteínas fusionadas a GST (“cebo”) se mezclaron con la fracción soluble de extractos proteicos de *E. coli* que expresaban proteína fusionada a los dominios ZZ (“presa”) (aproximadamente 300 µg de proteína de cada uno de los extractos) en columnas Handee™ Centrifuge columns de 0,8 ml (Pierce) y se llevó la mezcla a un volumen final de 800 µl en tampón de unión II [10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8, 5 mM DTT; cóctel inhibidor de proteasas “Complete EDTA-free” de Roche (1pastilla/50 ml), y salvo que se indique lo contrario 0,5% (v/v) de Triton X-100 y 150 mM NaCl]. Tras una hora de incubación de la mezcla a 4°C, se añadieron 12,5 µl de resina de glutatión-Sepharosa, equilibrada en tampón de unión II, a cada columna y se incubó la mezcla durante una hora más a 4°C. Tras la segunda incubación, se centrifugaron las muestras 1 min a 100·g en una microcentrífuga para eliminar el sobrenadante y se lavó la resina con 0,8 ml de tampón de unión II. Este proceso de lavado se repitió 6 veces, con la particularidad de que en los lavados 3º y 4º se incubó la resina con el tampón de unión II durante 15 minutos en agitación a 4°C. Después del último lavado, las proteínas retenidas en la matriz de glutatión-Sepharosa se eluyeron de la columna con 50 µl de tampón de ruptura, o bien con 50 µl de glutatión reducido 15 mM (GHS, Merck). Se cargaron 15µl del eluato de cada columna en geles de poliacrilamida al 10% con 0,1% de SDS. Finalizada las electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie G250 (Bio-Safe, Bio-Rad) para visualizar las proteínas.

Para el análisis cuantitativo de las bandas visualizadas con la tinción de Coomassie, se digitalizaron las imágenes de los geles y se analizaron las bandas mediante el programa Multi-Gauge de Fujifilm. La cantidad de proteína en cada banda se calculó en unidades arbitrarias según el tamaño del area que ocupaba la banda y la intensidad de los “pixels” contenidos en esta área y se corrigió de acuerdo a la masa molecular (Mr) de cada proteína.

3.8.4.4 Ensayos de pull-down con extractos de *A. Nidulans*

En columnas Handee™ Centrifuge columns de 0,8 ml (Pierce), se mezclaron extractos de *E.coli* que expresaban proteínas fusionadas a GST (300 µg de proteínas procedentes de la fracción soluble de extractos proteicos de *E. coli*) con 1mg de proteína de un extracto total de *Aspergillus nidulans*. Los extractos de proteínas de *Aspergillus nidulans* procedían de cultivos en medio sintético con etanol 1% (v/v) como fuente de carbono y 25 mM NaH₂PO₄, en los que las células sobreexpresaban las proteínas Vps32::GFP, Rab5::GFP y GFP, o bien de células cultivadas en MFA neutro que expresaban la proteína HA::Vp32 bajo el control del promotor constitutivo de *gpdA*. La mezcla se ajustó a un volumen final de 800 µl en tampón de unión III [10 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 5 mM DTT, cóctel inhibidor de proteasas “Complete EDTA-Free” de Roche (1 pastilla/50 ml); 1 mM Pefabloc; 0,3 µg/ml leupeptina; 0,3 µg/ml pepstatina y 2 µM MG132]. Tras una hora de incubación a 4°C en agitación, se añadió 12,5 µl de glutatión-Sepharose, equilibrada en tampón de unión III por columna. Las columnas se incubaron de nuevo durante una hora a 4°C en agitación; a continuación se centrifugaron (100·g, 1 minuto, 4°C), se eliminó el sobrenadante y se lavó la resina con 6 lavados de 0,8 ml de tampón de unión III cada uno, de la misma forma que se ha comentado anteriormente e el apartado 3.8.4.4. Las proteínas asociadas a la resina se eluyeron con 50 µl de tampón de ruptura. Se cargaron dos geles de poliacrilamida al 10% con 0,1% de SDS, cada uno con 20 µl del eluato de las columnas. Uno de ellos se tiñó con Coomassie G250, para visualizar las proteínas fusionadas a la GST que habían sido usadas como cebo, y el otro se electrotransfirió para la detección mediante western-blot de los cebos.

3.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La mayor parte de las muestras se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia Eclipse E-600 de Nikon, equipado con objetivos de 60 x y 100 x aumentos con 1,4 de apertura numérica, una lámpara de mercurio de 100 W, un filtro GFP-3035B (Semrock Brighthline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP y un filtro TXRED-4040B (Semrock Brighthline) para la detección de la fluorescencia emitida por mRFP, CherryFP o FM4-64. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics) y se utilizaron los programas de obtención y tratamiento de imágenes Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Molecular Devices).

Para la obtención de películas se utilizó un microscopio invertido LEICA DMI6000B con el eje Z motorizado, equipado con objetivos 63 x y 100 x con 1,4 de apertura numérica, una lámpara Leica EL6000, un incubador (Tempcontrol 37-2 digital, PECON), un filtro TX2 (Leica) para la detección de la fluorescencia emitida por FM4-64, CherryFP o mRFP y un filtro GFP-3035B (Semrock Brighthline) para la detección de la

fluorescencia emitida por GFP. Las secuencias de imágenes se obtuvieron con una cámara digital ORCA-ERII (Hamamatsu Photonics) y con el programa Metamorph, a través del cual se controlaba automáticamente el microscopio.

3.9.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y MEDIOS DE OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Con objeto de evitar la precipitación de las sales de fosfato presentes en los elementos traza y su interferencia en la observación al microscopio, se utilizó un medio basal denominado WMM (“*watch minimal medium*”), una versión del MMA de Cove²²³ (véase Material y Métodos, apartado 3.1.4) suplementada, de no indicarse lo contrario, con 25 mM NaH₂PO₄, lo que provoca que el pH del medio sea de 5,1 - 5,2. El WMM se suplementó, además de con los requerimientos necesarios de cada cepa y con 5 mM tartrato amónico, con distintas fuentes de carbono en función de las condiciones del experimento (glucosa, fructosa o etanol).

En la preparación de las muestras para su observación al microscopio Eclipse E-600 de Nikon, las germínulas se cultivaron sobre la superficie de cubreobjetos de vidrio redondos de 14x14 mm o cuadrados de 18x18mm (Menzel-Gläser), colocados en placas de 6 pocillos (Falcon) y sumergidos en 2,5 ml de medio inoculado con conidiosporas. Los cubres así preparados se incubaron a ~ 25 °C durante distintos tiempos. Las células crecieron sobre la superficie del cubreobjetos y para su observación se escurrió con una servilleta el exceso de medio del cubreobjetos y se dispuso éste sobre un portaobjetos, de modo que las germínulas quedaron entre el porta y el cubre. El montaje del cubre sobre el portaobjetos provocaba que, al cabo del tiempo, la germínulas situadas en la región central estuviesen en condiciones de anaerobiosis. Esto perjudicaría la observación de procesos dependientes de energía como el movimiento de los endosomas. Por tanto, para la obtención de películas en el microscopio LEICA DMI6000B, se usaron cámaras de cultivo de cuatro pocillos Lab-Tek, (NuncTM).

3.9.2 MEDIOS PARA EL CULTIVO DE ESTIRPES CON TRANSGENES QUE SE EXPRESAN BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DEL GEN *gpdA* O BAJO EL PROMOTOR DEL GEN *alcA*

En el estudio de la localización de proteínas fluorescentes expresadas a niveles fisiológicos, o bien bajo el control del promotor constitutivo del gen de la *glicerol-3-fosfato deshidrogenasa* (*gpdA*^P), se empleó, como fuente de carbono, glucosa a una concentración de 0,05 % (p/v). En experimentos en los que la expresión de la proteína depende del promotor de *alcA*^P, el nivel de expresión de la proteína se reguló usando diferentes fuentes de carbono. Niveles altos de expresión se obtuvieron cultivando las esporas en un medio con 1% de etanol (i.e. estirpes: *alcA*^P::*palC*::*GFP*), o germinando las esporas en cultivos con glucosa al 0,02-0,05 % (p/v), y transfiriendo después las germínulas a un medio con etanol 1% (v/v) en las que se las incubó durante 3 a 4 horas adicionales (i.e. estirpes: *alcA*^P::*palA*::*GFP*). No obstante, se puede reducir el nivel de expresión de la proteína cultivando las células en condiciones de no inducción-no represión del promotor *alcA*^P, en medio con 0,1% (p/v) de fructosa como fuente de carbono (i.e. estirpes: *alcA*^P::*vps32*::*GFP*)

3.9.3 EXPERIMENTOS DE CAMBIO DE pH

En los experimentos en los que se realizó un cambio de pH, los conidios germinaron en el medio WMM ajustado a un pH 5,1-5,2 con 25 mM NaH_2PO_4 . Tras 16-18h de incubación, las células se transfirieron a un medio ajustado a pH ácido con 25 mM NaH_2PO_4 , a un medio ajustado a pH neutro (pH ~ 7) con 12,5 mM NaH_2PO_4 y 12,5 mM Na_2HPO_4 o a un medio ajustado a pH alcalino (pH 8,2-8,3) con 25 mM Na_2HPO_4 . En el caso de las estirpes *alcA^p::palC::GFP*, las conidiosporas se cultivaron en un medio con 1% (v/v) etanol a pH ácido durante 18 horas a ~ 25°C y, además del cambio de pH del medio, se cambió la fuente de carbono a 1% glucosa, para reprimir el promotor *alcA*. Debido a esto, los experimentos de cambio de pH, en las estirpes que expresan *PalC::GFP* bajo el promotor de *palC*, se realizaron a medios con 1% glucosa. En el caso de las estirpes *alcA^p::palA::GFP*, las conidiosporas se cultivaron primero a pH ácido en un medio con glucosa al 0,02% durante 12 horas y se transfirieron después a un medio a pH ácido con etanol 1%, para inducir la expresión del transgén. Las células se incubaron en este medio durante tres horas, al cabo de las cuales se volvieron a transferir a un nuevo medio con pH ácido, alcalino o neutro y esta vez con 1% de glucosa como fuente de carbono en todas las condiciones de pH.

El conteo de las estructuras que aparecen como consecuencia del cambio de pH ácido a pH alcalino se realizó en todos los casos 30 minutos después del cambio de medio, salvo que se indique lo contrario. El número de germínulas analizadas en cada una de las estirpes fue siempre igual, o superior a 20, y el conteo de las estructuras se normalizó con respecto a la longitud de cada una de las germínulas. Se analizaron siempre dos estirpes isogénicas independientes de cada uno de los cruces, y al menos dos transformantes de cada transformación. Se determinó el número de estructuras punteadas por micra en cada germínula y se calculó posteriormente la media del total de germínulas analizadas. Para determinar si las diferencias observadas entre las distintas estirpes eran significativas se calculó el error estándar de cada una de las medias.

3.9.4 EXPERIMENTOS DE MARCAJE *IN VIVO* CON FM4-64

Los experimentos con el fluoróforo FM4-64 se realizaron siguiendo dos protocolos distintos, dependiendo de si la muestra se observaba en el microscopio Eclipse E-600 de Nikon o en el microscopio LEICA DMI6000B. Los experimentos de colocalización de *PalC::GFP* con FM4-64 en el microscopio Eclipse E-600 de Nikon se realizaron tal y como aparece descrito en Peñalva et al.²³⁸. Las conidiosporas germinaron sobre la superficie de cubreobjetos cuadrados de 18x18. Los cubreobjetos se depositaron en la tapa de una placa multipocillo que estaba flotando en un baño de hielo, con la superficie sobre la que habían crecido las germínulas hacia arriba. El cubreobjetos se cubrió con 300 µl de medio que contenía 10 µM de FM4-64 (de una solución stock a 3,24 mM en DMSO). Los cubres se mantuvieron a 0°C durante 10 minutos, se lavaron con 2,5 ml de medio y se transfirieron a placas multipocillos con 2,5 ml de medio por pocillo. Los cubres se incubaron en las

placas multipocillo en agitación (80 r.p.m) y a una temperatura de ~ 25°C durante diferentes tiempos antes de su observación al microscopio. En estas condiciones, al cabo de 5-10 minutos se marca la membrana de los endosomas tempranos.

En los experimentos de colocalización de PalA::GFP con FM4-64 en el microscopio LEICA DMI6000B se utilizaron cámaras de cultivo de cuatro pocillos (Lab-tek; NuncTM). El medio en el que habían germinado las conidiosporas se cambió por medio con 5 µM de FM4-64. Después de cinco minutos de incubación se eliminó el medio que contenía FM4-64 y el pocillo se lavó tres veces con el mismo volumen de medio, antes de su observación al microscopio.

3.9.5 SECUENCIA DE IMÁGENES “TIME LAPSE”: DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LOS ENDOSOMAS.

En las secuencias de imágenes tomadas mediante la técnica de “time-lapse” la trayectoria de las estructuras móviles que se marcan con FM4-64, o que contienen a GFP::RabA, se determinó manualmente. La posición de cada una de estas estructuras, en función del tiempo transcurrido en la adquisición de cada una de las fotografías, permitió determinar la velocidad media de los endosomas tempranos. El análisis de la imágenes se llevo cabo con el programa Metamorph (Universal Image) en cual se había calibrado el número de pixels que corresponden con

3.10 “KITS” DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA UTILIZADOS

Los diferentes “kits” se utilizaron siguiendo en todo momento las instrucciones de los respectivos fabricantes.

FastDNA® Kit BIO101® Systems (Q-BIOgene): se utilizó para la extracción de DNA genómico tanto de *A. nidulans* como de *S. cerevisiae*.

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de productos de PCR.

QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de electroforesis en geles de agarosa.

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de plásmidos procedentes de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche): se utilizó para la purificación rutinaria de plásmidos procedentes de *E. coli*.

TOPO TA Cloning® Version P (Invitrogen): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO mediante ligación por topoisomerasas.

pGEM T-Easy Vector System (Promega): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pGEM T-Easy mediante ligación por topoisomerasas.

Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen): se utilizó para sintetizar cDNA monohebra a partir de RNA total de *A. nidulans*.

TNT Coupled Transcription-Translation System (Promega): se utilizó para la síntesis *in vitro* de proteínas y su marcaje con metionina [^{35}S] (1,000 Ci/mmol).

Rediprime™ II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences): se utilizó para el marcaje de fragmentos de DNA con [α - ^{32}P] dCTP que fueron posteriormente utilizados como sondas en ensayos de Southern-Blot.

ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences): se utilizó para la limpieza de las sondas marcadas radiactivamente con el kit anterior.

PlusOne™ Silver Staining kit Protein (Amersham Biosciences): se utilizó para la tinción de geles de poliacrilamida y la visualización de proteínas en estos geles.

ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences): se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de Western Blot.

3.11 PRODUCTOS RADIOACTIVOS

En la hibridaciones DNA-DNA se empleó [α - ^{32}P] dCTP con una actividad específica de 3000 Ci/mmol (“Amersham Biosciences Redivue Deoxycytidine 5'-triphosphate, [α - ^{32}P]”). Para el marcaje de proteínas se utilizó ^{35}S -Met con una actividad específica de 10mCi/ml (“Amersham Biosciences Redivue L-[^{35}S]methionine”).

3.12 REACTIVOS Y ENZIMAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Los reactivos químicos utilizados y los suplementos de los medios de cultivo fueron de calidad analítica, generalmente de las marcas Sigma, Fluka y Merck. Los componentes de origen microbiológico de los medios de cultivo utilizados fueron suministrados por Difco Laboratories o Pronadisa.

Las enzimas de restricción utilizadas procedían de New England Biolabs, Roche o Takara. Los reactivos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Amersham (AmpliTAQ®), Promega (*Pfu* DNA polimerase) y Takara (Prime Star® HS DNA polimerase). La DNA Ligasa del fago T4 fue adquirida a Takara.

3.13 ALINEAMIENTOS DE SECUENCIAS

Los alineamientos múltiples de secuencia se realizaron con el programa T-Coffee²³⁹ y se corrigieron manualmente con el programa Genedoc²⁴⁰.

RESULTADOS

Capítulo I

4. RESULTADOS – Capítulo I

4.1 PalC JUEGA UN PAPEL CLAVE EN EL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE PacC

4.1.1 LA PROTEÍNA PALC ES NECESARIA PARA QUE SE PRODUZCA EL CORTE PROTEOLÍTICO SEÑALIZADOR

PacC media la respuesta transcripcional dependiente del pH ambiental. Cuando el pH ambiental es alcalino, la ruta *pal* de transducción de señal provoca la activación proteolítica en dos pasos de PacC⁷², que se convierte en PacC⁵³, mediante una “proteasa señalizadora” que responde a la señal de pH. PacC⁵³ es un intermediario predeterminado a convertirse en PacC²⁷ gracias a la acción del proteosoma (revisado en Peñalva et al.¹³⁸, véase introducción).

En la transducción de la señal de pH participan seis proteínas: PalA, PalB, PalC, PalF, PalH y PalI. Antes del comienzo de este trabajo se desconocía el papel molecular preciso de PalC. Se ha demostrado que el procesamiento de PacC está bloqueado en mutantes *palA*⁻¹⁴⁶, *palB*⁻¹⁵⁰ y *palI*⁻¹³⁶. Sin embargo, nunca se había analizado el procesamiento de PacC en un mutante *palC*⁻, a nivel molecular.

Con el fin de investigar el papel de PalC en la activación de PacC, se analizó el procesamiento de PacC en un fondo genético *palC4*. El reemplazamiento de *pacC* por el alelo *pacC900* da lugar a la expresión, a niveles fisiológicos, de PacC⁷², marcada en su extremo amino terminal con tres copias del epítipo c-Myc. Las estirpes que portan este alelo tienen un fenotipo idéntico a las estirpes silvestres que expresan PacC sin el epítipo^{150,241}. La mutación *palC4* provoca la pérdida de función de PalC, ya que da lugar a una proteína PalC truncada: la delección de una adenina en el codón 366 ocasiona un cambio en el marco de lectura, con lo que solamente se traducen los 365 aminoácidos N-terminales de los 507 residuos que forman la proteína completa¹³⁴. Las estirpes con el alelo *palC4* se caracterizan por su crecimiento nulo a pH alcalino, su hipersensibilidad a molibdato y su resistencia a neomicina. Este fenotipo es indistinguible del que muestra una estirpe con un alelo *palCA* (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.1.2).

Se analizó por western-blot la activación por pH alcalino del procesamiento de (Myc)₃::PacC en fondos genéticos *palC*⁺ (Figura CR.-1, carriles 1-5) y *palC4* (Figura CR.-1, carriles 6-10). En la estirpe silvestre se observa que PacC⁷² es la única forma detectable a pH ácido. Con el cambio del pH del medio a pH alcalino se inicia el procesamiento secuencial de PacC⁷² y, tras 15 minutos de incubación en condiciones alcalinas, se detecta no sólo PacC⁷² sino también PacC⁵³, como consecuencia del primer paso proteolítico. Tras 30 minutos a pH alcalino aparecen las tres formas de PacC: PacC⁷², PacC⁵³ (que es la forma mayoritaria) y PacC²⁷. Sin embargo, en las muestras correspondientes a los 60 minutos en medio alcalino PacC⁷² no se detecta y la forma mayoritaria es PacC²⁷. Tras dos horas a pH alcalino, se observan nuevamente en el western-blot las tres formas de PacC: PacC⁷², que procede de síntesis de novo, PacC⁵³ y PacC²⁷¹⁵³.

En células *palC4* se detectó exclusivamente PacC^{72} , tanto en medio ácido como en medio alcalino (Figura CR.-1, carriles 6-10). Por tanto, el procesamiento de PacC^{72} se encuentra bloqueado por completo en ausencia de una proteína PalC funcional.

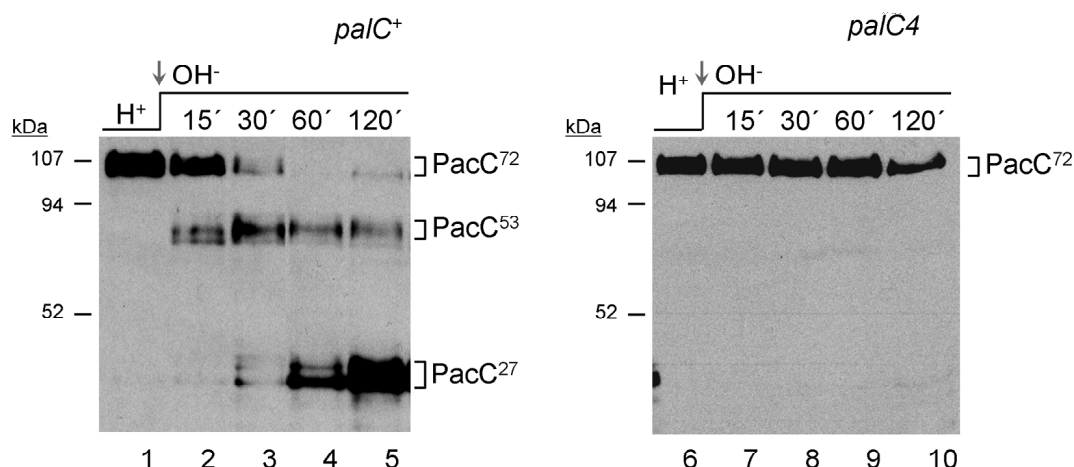


Figura CR.-1: Efecto del alelo *palC4* en el procesamiento de *PacC*. Respuesta a corto plazo a la alcalinización del medio: células *palC*⁺ (carriles 1-5) y *palC4* (carriles 6-10) cultivadas en condiciones ácidas (H^+ : pH 4,5) se transfirieron a condiciones alcalinas (OH^- : pH 8,4). Las muestras se analizaron por western-blot con el anticuerpo α -Myc. Los tiempos indican los minutos transcurridos una vez transferido el micelio a condiciones alcalinas.

4.1.2 LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA *pal* NO CAUSA MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EVIDENTES O INCREMENTO EN LA SÍNTESIS DE PalC.

Se decidió estudiar si la activación de la ruta *pal* provoca una modificación post-traduccional de PalC o un cambio en los niveles de la proteína, debido a diferencias en su expresión y/o a una estabilidad diferencial de la proteína dependientes del pH ambiental.

Para ello se etiquetó la proteína PalC con tres copias del epítipo HA en el extremo carboxilo-terminal. Se creó, mediante reemplazamiento génico, el alelo *palC300*, que codifica para la proteína de fusión $\text{PalC}::(\text{HA})_3$. El reemplazamiento de *palC* por *palC300* asegura que $\text{PalC}::(\text{HA})_3$ se exprese a niveles fisiológicos y que su síntesis se regule de manera análoga a la de PalC (Figura CR.-2A). En las pruebas de cultivo en medio sólido, la estirpe *palC300* tiene un fenotipo idéntico a la estirpe silvestre (Figura CR.-2B). Las condiciones examinadas son diagnósticas del funcionamiento del sistema de regulación por pH ambiental. Por lo tanto, el hecho de que el fenotipo de una estirpe *palC300* sea indistinguible del de una estirpe silvestre indica que el etiquetado de PalC con $(\text{HA})_3$ en su extremo carboxilo terminal no afecta a la función de la proteína.

Se analizó el efecto de la respuesta a la señal de pH alcalino en una estirpe *palC300* en experimentos de cambio de pH. El análisis por western-blot reveló, por un lado, que la cinética de procesamiento de PacC^{72} es similar en las estirpes que expresan $\text{PalC}::(\text{HA})_3$ o PalC sin el epítipo (Figura CR.-2C, arriba; compárense los carriles 1-5 con los carriles 6-10); y, por otro lado, que ni los niveles de $\text{PalC}::(\text{HA})_3$, ni la movilidad electroforética de la proteína varían con el cambio del pH ambiental (Figura CR.-2C, abajo; compárense los carriles 1-5 con los carriles 6-10).

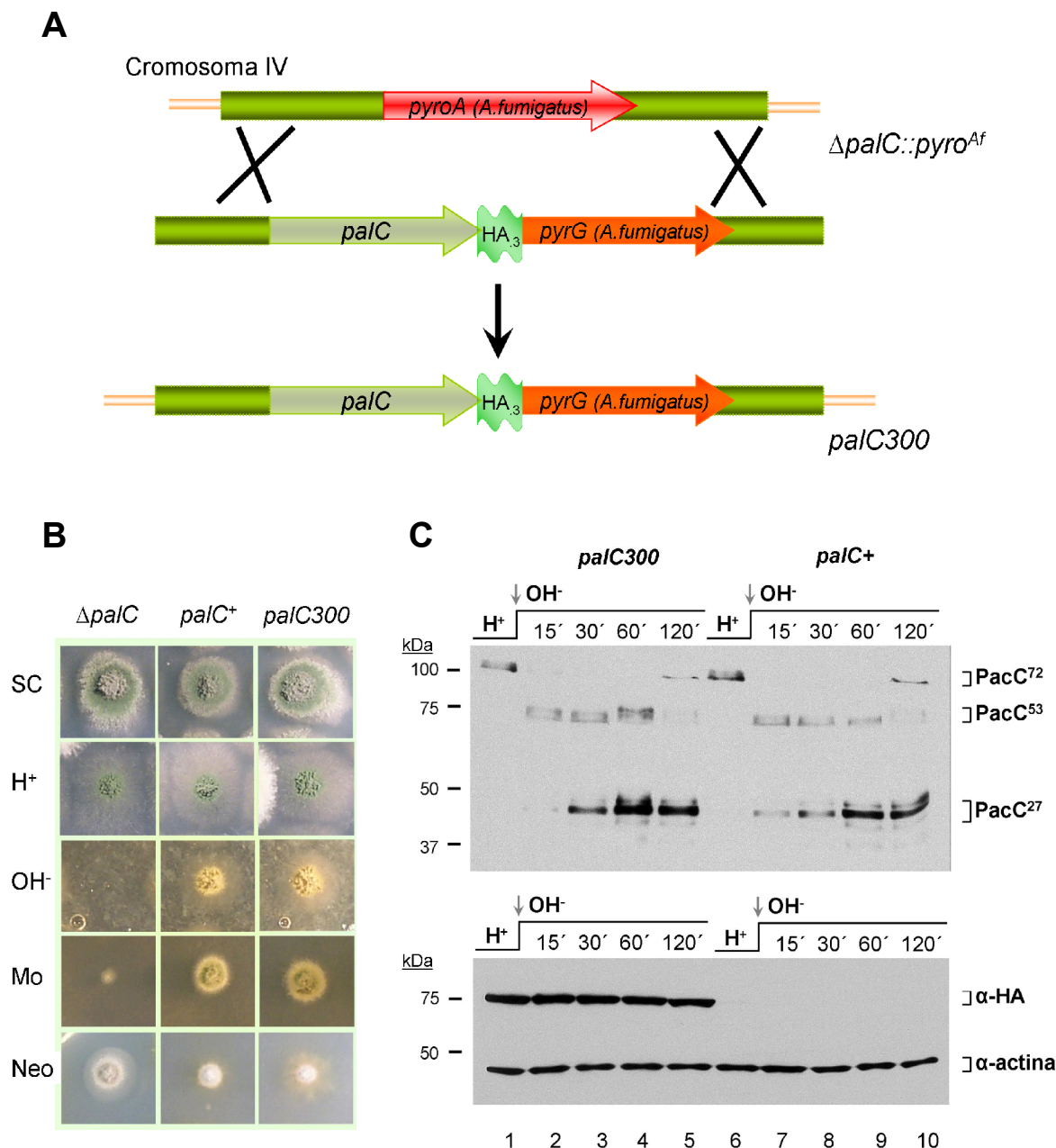


Figura CR.-2: PalC no sufre modificaciones postraduccionales como consecuencia de la activación de la ruta *pal*.

A) Representación esquemática de la estrategia empleada para generar el alelo *palC300*. Se delecionó *palC* por reemplazamiento génico con *pyroA* de *Aspergillus fumigatus*. En la cepa $\Delta palC::pyroA$ se reemplazó el gen *pyroA*^{A.f} por *palC::HA₃::pyrG*^{A.f}. B) Test de crecimiento en medio sólido en el que se comparan las estirpes $\Delta palC::pyroA$, *palC300* y una estirpe control, isogénica con la estirpe *palC300*, pero con un codón stop antes del epítipo HA. Las placas contienen MMA con glucosa al 1% como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada estirpe. SC: medio sintético completo; H⁺: placas con 500 mM NaH₂PO₄ (pH~5); OH⁻: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8); Mo: 25 mM Na₂MoO₄; Neo: 2,2 mM sulfato de neomicina. C) Análisis mediante western-blot de la estirpe *palC300*: células *palC300 pacC900* (carriles 1-5) y *palC⁺ pacC900* (carriles 6-10) cultivadas en condiciones ácidas (H⁺: pH 4,5) se transfirieron a condiciones alcalinas (OH⁻: pH 8,4). Las muestras tomadas en los tiempos que aparecen indicados se analizaron mediante western-blot con anticuerpos α-Myc (arriba) para determinar el procesamiento de PacC, con α-HA para detectar PalC y con α-actina como control de carga. Las posiciones de PalC::HA₃ y de la actina se indican con corchetes.

El procesamiento de PacC⁷² de forma indistinguible, tanto en las estirpes silvestres como las estirpes *palC300*, corrobora los resultados obtenidos en el análisis fenotípico: el alelo *palC300* codifica para una proteína completamente funcional. PalC:::(HA)₃ no experimenta ninguna modificación post-traducciona detectable por un cambio en la movilidad electroforética como consecuencia del cambio de pH ambiental. Además, los niveles de la proteína no se modifican por la activación de la ruta *pal* (Figura CR.-2C, abajo). Por tanto, hipotetizamos que, la función de PalC en la transducción de la señal de pH debe depender de su localización subcelular o de su interacción con otras proteínas de manera dependiente del pH ambiental.

4.2 PalC INTERACCIONA CON COMPONENTES DEL COMPLEJO ESCRT-III

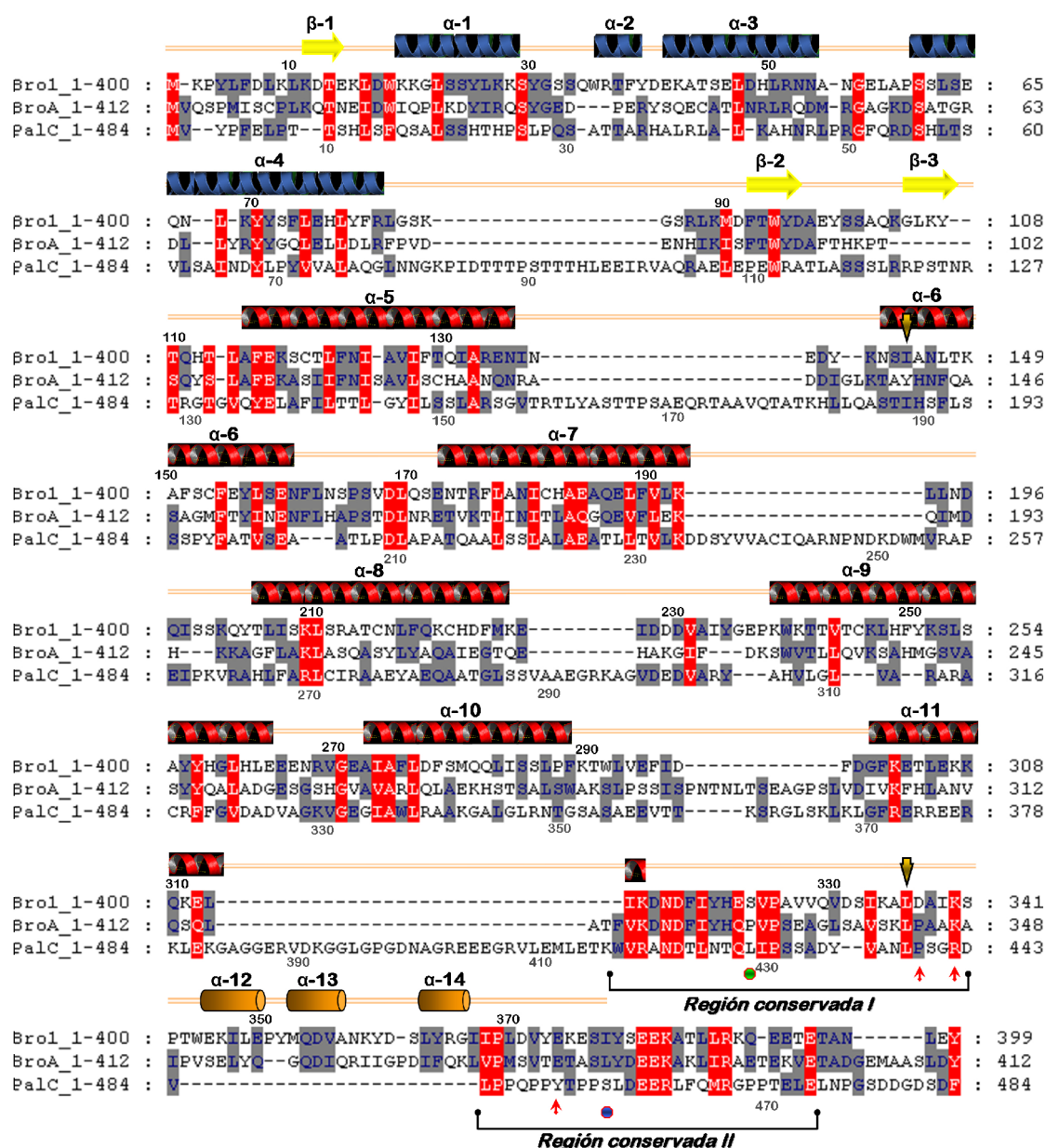
4.2.1 DEFINICIÓN DEL DOMINIO Bro1 AMINO TERMINAL DE PalC

Estudios de nuestro laboratorio, previos al inicio de este trabajo, habían demostrado, mediante análisis bioinformático, que la región de PalC comprendida entre los residuos 28 a 235 presenta una similitud significativa con el dominio PFAM PF03097 “BRO1-like”. El alineamiento múltiple entre homólogos de PalC y proteínas con dominio Bro1 señaló, además, que había una región adicional de similitud, más allá de los límites del dominio tal y como éste estaba definido en la base de datos PFAM, por lo que se denominó a esta región amino terminal de PalC como “PalC-Bro1 homology” (PCBROH). El hecho de que sustituciones de un solo aminoácido, dentro de dicha región, den lugar a un fenotipo de pérdida de función puso de manifiesto su papel funcional o estructural¹³⁵.

Dentro de la familia de proteínas con dominio Bro1 se incluye PalA¹³², su ortólogo en *S. cerevisiae*, Rim20¹¹⁰, el homólogo en humanos de PalA, AIP1/Alix²⁴², y la proteína de *S. cerevisiae* Bro1p/Vps31p¹⁹¹ que participa en la biogénesis de los MVBs^{97,99,186}. El trabajo de Kim et al.⁹⁶ sobre la estructura tridimensional del dominio Bro1 de Bro1p demostró que el dominio se corresponde con los primeros 367 residuos N-terminales. Por tanto es mucho mayor que los 160 residuos definidos usando el modelo oculto de Markov (“hidden Markov model”, HMM)²⁴³.

Figura CR.-3: El dominio Bro1 de PalC. Alineamiento de Bro1p de *S.cerevisiae* con BroA y PalC. En la figura se muestra la secuencia de Bro1p desde el residuo 1 al 400, corriente abajo de este residuo no existe similitud con PalC. La estructura tridimensional del residuo 1 al 387 de Bro1p ha sido descrita por Kim et al, y los motivos de estructura secundaria se indican encima de su secuencia (en azul las α -hélices en posición N-terminal; en rojo las α -hélices que forman el dominio TPR; los cilindros naranjas representan las α -hélices en posición C-terminal, que contribuyen a la estabilidad de la estructura; las láminas β se representan como flechas amarillas). Los residuos conservados en la secuencia de las tres proteínas están resaltados en rojo, mientras que en gris aparecen aquellos residuos conservados sólo en dos de las secuencias. Los aminoácidos Ile188 y Leu336 de Bro1p, que están implicados en la unión de esta proteína a Vps32, están señalados con flechas grandes. Dentro de las regiones conservadas mencionadas en el texto, se indican los residuos Pro439, Lys442, Tyr451 de PalC (flechas rojas). Sustituciones en estos residuos causan pérdida de función de PalC. También, aparecen señalados en la figura las posiciones de los truncamientos correspondientes a los alelos *palC131* (S455fs, círculo azul) y *palC179* (L427stop, círculo verde), que dan lugar a un fenotipo de pérdida parcial y de pérdida completa de función, respectivamente. La posición de los residuos de Bro1p y PalC aparece marcada encima o debajo de cada una de sus secuencias.

96 135 135



96 135 135

Atendiendo a la nueva definición del dominio, se analizó detalladamente la similitud de la secuencia aminoacídica de Bro1p con su ortólogo en *A. nidulans*, BroA, y con PalC. En la Figura CR.-3 se muestra un alineamiento triple que comprende los dominios Bro1 en Bro1p, BroA y PalC. La similitud de secuencia es evidente en varias de las regiones que se encuentran dentro del dominio Bro1 de Bro1p, definido cristalográficamente, lo que apoya los resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio. La estructura del dominio Bro1 está compuesta básicamente por α -hélices: 11 α -hélices que modelan un soleinodo en el que las hélices 5 a 11 forman un dominio TPR (“tetratricopeptide-repeat). Esta estructura se compone de tres pares de α -hélices, más una última α -hélice en posición C-terminal (α -hélice 11) ⁹⁶. En general, las regiones donde hay una

mayor divergencia entre Bro1p y PalC se encuentran en los bordes o en inserciones entre las distintas α -hélices, mientras que la mayor similitud de secuencia se halla en las regiones que forman dichas α -hélices. Sin embargo, hay que señalar que hay excepciones, como dos regiones conservadas que aparecen a partir del residuo 312 de Bro1p (Figura CR.-3). La primera de estas regiones (región I) comprende los residuos 313 al 340 de Bro1p. Incluye, por tanto, los residuos de Bro1p Leu336, Ala338 e Ile339 que, en la estructura atómica de la proteína, forman parte de una superficie hidrofóbica (“patch 1”). Esta superficie hidrofóbica está flanqueada por aminoácidos polares como la Lys340⁹⁶ (Figura CR.-4). La segunda de estas regiones conservadas (región II) comprende los residuos 367 a 394 y, desafortunadamente, comienza en el último residuo donde la estructura capturada en el cristal de Bro1p está ordenada, por lo que no se dispone de información estructural. En PalC, dentro de esta región II hay un motivo rico en prolina con una tirosina central, la tirosina 451. Se ha comprobado que la sustitución Tyr451Asn afecta a la señalización por pH¹³⁵.

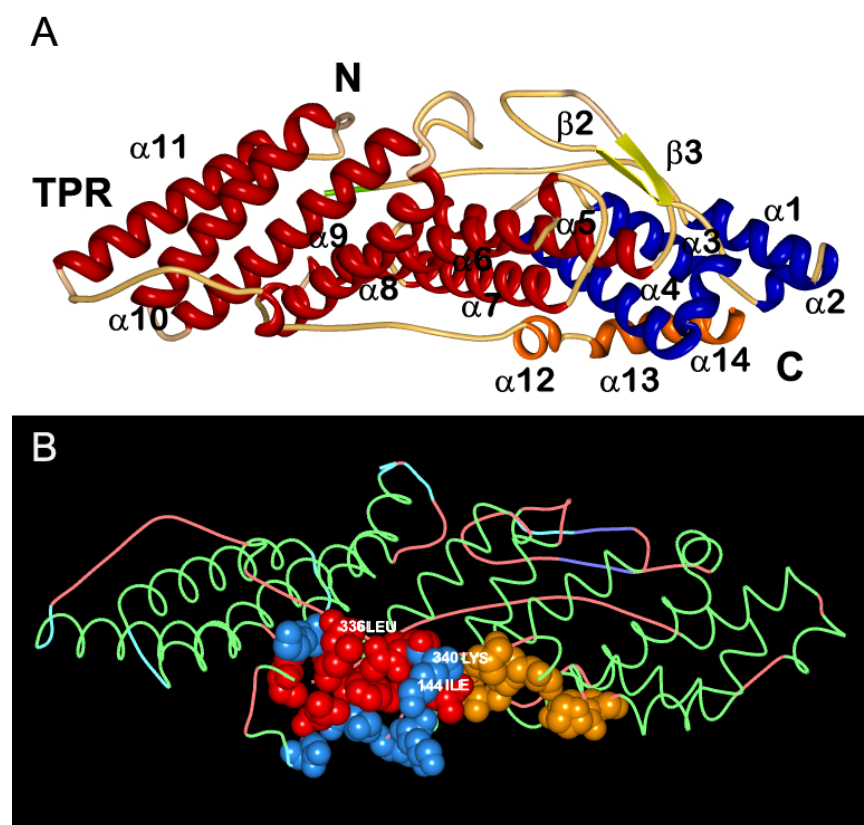


Figura CR.-4.: Estructura de Bro1. A) Vista general del dominio Bro1 de Bro1p. La región N-terminal está coloreada de verde; las α -hélices en posición N-terminal que no pertenecen al dominio TPR están coloreadas de azul; las láminas β están coloreadas de amarillo; el dominio TPR está coloreado de rojo y la región C-terminal está coloreada de naranja. B) Vista de la región hidrofóbica implicada en la interacción con Vps32. La estructura está rotada 90° hacia el observador con respecto a la vista anterior. Resaltados sobre la estructura secundaria (hélices α en verde y láminas β en violeta), aparecen los residuos que forman la superficie de interacción con Vps32 (“patch 1”): dos cadenas de residuos hidrofóbicos (rojo y amarillo) separadas por una banda de residuos polares (azul). En la figura aparecen señalados los residuos que se ha demostrado que son críticos en la interacción de Bro1p con Vps32p.

Una de las características de las proteínas que poseen el dominio Bro1 es su capacidad para interactuar con Vps32, un componente del ESCRT-III. Kim et al.⁹⁶ demostraron que la superficie hidrofóbica de Bro1p, de la cual forman parte los residuos Leu336, Ala338 e Ile339 (“patch 1”), juega un papel esencial en la interacción con Vps32. De hecho, las sustituciones Leu336Ala e Ile144Asp eliminan dicha interacción. En la estructura terciaria de Bro1p, el residuo Ile144 aparece formando parte de la misma superficie hidrofóbica que la Leu336⁹⁶

(Figura CR.-4B). Tanto la Leu336 como la Ile144 están conservadas en PalC (Leu438 e Ile188). La sustitución de un residuo adyacente a la Leu438 de PalC (Pro439Phe) da lugar a un fenotipo de pérdida de función¹³⁵. Además, PalC tiene un residuo arginina (Arg442) que se corresponde con la Lys340 de Bro1p. La delección, o la sustitución, a His de este residuo ocasiona la pérdida total o parcial de función de la proteína, respectivamente. Todos estos datos indicaron que PalC podría interaccionar con Vps32 a través de la región I.

La estructura del dominio Bro1 en Bro1p muestra que las regiones N y C-terminal del dominio juegan un papel crítico en su estabilidad. El dominio Bro1 tiene una forma que recuerda a un boomerang y sus extremos empaquetan la estructura, de manera que el extremo N-terminal se pliega sobre el lado convexo del dominio, mientras que el extremo C-terminal rellena el lado cóncavo (Figura CR.-4A). Ambos extremos se estabilizan interaccionando con regiones que están muy conservadas, y se ha comprobado que delecciones de regiones cercanas a cualquiera de los bordes del dominio hacen que la proteína que se expresa sea insoluble⁹⁶.

Este hecho podría explicar por qué las mutaciones obtenidas en el análisis mutacional de *palC*¹³⁵, que truncan la proteína aguas arriba del residuo 427, tienen un fenotipo de pérdida total de función; y por qué la única mutación que trunca la proteína aguas abajo de ese residuo, *palC131* (que codifica para una proteína truncada en el residuo 454), tiene un fenotipo de pérdida parcial de función¹³⁵. En esta proteína mutante, el sitio de truncamiento se encuentra fuera de la región que se alinea con el dominio Bro1 de Bro1p, lo que le haría perder una región C-terminal que contribuye a la función sin dismantelar el dominio Bro1.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL ESCRT-III EN *A. nidulans*

Los complejos ESCRT en las membranas endosomales están implicados en la transducción de señal de pH¹¹¹. Nuestro laboratorio había demostrado que PalA interacciona con Vps32¹⁰⁰. La caracterización *in silico* del dominio Bro1 de PalC nos llevó a pensar que era muy probable que esta proteína también interaccionase con Vps32, o con alguna otra proteína del ESCRT-III.

Para explorar esta hipótesis se procedió a identificar y caracterizar todos los componentes del ESCRT-III en *A. nidulans*, en especial aquellos que poseen un dominio Snf7 (PF03357). Dicho dominio se identificó por primera vez en Vps32p/Snf7p de *S. cerevisiae* y se encuentra además en otras cinco proteínas que bien forman el complejo ESCRT-III, o se asocian a él, denominadas “ESCRT-III like proteins”^{39,70,78}. Se predijo la presencia de los ortólogos en *A. nidulans* de Vps2p, Vps20p, Vps24p, Vps60p y Did2/Vps46p, que junto con el ortólogo de Vp32p (caracterizado previamente por O. Vincent et al.¹⁰⁰), comprenden las seis “ESCRT-III like proteins”.

Con la colaboración de la Dra. O. Rodríguez-Galán se caracterizaron los genes codificantes de cada una de estas proteínas, así como los correspondientes a los ortólogos de Vps25p y Vps4p. En la identificación *in silico* de las regiones codificantes, se utilizaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *S. cerevisiae* para rastrear la base de *Aspergillus nidulans* del Broad Institute (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html) usando el programa de comparación de secuencias TBLASTN²⁴⁴.

Nomenclatura usada en el texto	Nombre propuesto A.nidulans	Homólogo en S.cerevisae	Homólogo en H.sapiens	Nombre sistemático
Vps25	escE ^{Vps25}	Vps25p	EAP20	-
Vps2	escG ^{Vps2}	Vps2p	CHMP2A/B	AN6898
Vps20	escH ^{Vps20}	Vps20p	CHMP6	AN1365
Vps24	escI ^{Vps24}	Vps24p	CHMP3	AN6920
Vps32	escJ ^{Vps32}	Vps32p	CHMP4A/B/C	AN4240
DidB	didB ^{Did2}	Did2p	CHMP1A/B	AN9396
Vps60		Vps60p	CHMP5	AN5632
Vps4		Vps4p	Vps4A/B	AN3061

Tabla.-CR1: Componentes del ESCRT-III en *A.nidulans*. En la tabla se listan las proteínas del complejo ESCRT-III, sus proteínas accesorias DidB, Vps60, Vps4 y la proteína del complejo ESCRT-II Vps25. También se recoge la notación sistemática de los correspondientes modelos génicos en la base de datos de *Aspergillus nidulans* del Broad Institute, a excepción de la de Vps25, que no está correctamente reconstruida *in silico* y está, por tanto, ausente de la base de datos.

Se realizó una primera predicción de la estructura de cada gen, que nos permitió amplificar por PCR la secuencia codificante a partir de una librería de cDNA total de *A.nidulans* (véase Material y Métodos) (Tabla CR.-1 y 2) y determinar la estructura de los distintos genes (posición de los intrones y exones) por secuenciación del cDNA y comparación con la secuencia genómica (Tabla CR.-2). Una vez disponibles las versiones de cDNA de los diferentes componentes de ESCRT-III, se usó el sistema de doble híbrido (2H) para buscar la posible interacción entre PalC y dichos componentes. Existe una gran cantidad de datos acerca de la estructura del ESCRT-III y de las interacciones entre sus componentes en *S. cerevisiae* ^{115,190} (revisado en Hurley et al. ⁴⁹). Esto nos permitía validar la interactividad de las proteínas de fusión que iban a ser utilizadas como cebos y presas en los ensayos de 2H, usándolas en combinaciones que ya hubieran sido descritas como interaccionantes en la literatura.

Cada uno de los componentes del ESCRT-III, así como Vps25 y Vps4, se fusionaron al dominio de unión al DNA (DBD) y al dominio de activación (AD) del factor de transcripción Gal4. Se podía así buscar los posibles interactores de cada proteína usándola tanto como cebo (DBD) o como presa (AD). Vps25 es una proteína complejo del ESCRT-II, de tamaño similar a las proteínas del ESCRT-III, que carece del dominio SNF7 pero que, al igual que estas últimas, presenta en su secuencia motivos “coiled-coil” (α -hélices que se estabilizan enrollándose unas a otras). El complejo ESCRT-II interacciona con ESCRT-III a través de la región C-terminal de Vps25, que se une directamente a Vps20 ^{70,71}. Por otro lado Vps4 es una AAA-ATPasa que oligomeriza formando dos anillos hexaméricos ⁸⁹ y desensambla el complejo ESCRT-III ⁸⁸. Recientemente se ha descubierto que Vps4p se asocia al complejo ESCRT-III a través de su interacción con Vps2p ^{82,87}. Did2p, ortólogo de DidB en *S.cerevisae*, y Vps2p se unen directamente al dominio MIT N-terminal de Vps4p ^{82,87,199}. Así pues, Vps25 y Vps4 son interactores directos de proteínas del ESCRT-III. Por tanto, procedimos a incluir a estas dos proteínas en los ensayos de 2H como controles que diesen lugar a interacciones positivas relativamente fuertes.

Nomenclatura usada en el texto	Dominios PFAM	Longitud del dominio (aa.)	Cromosoma	Tamaño del gen (bps)	Secuencia codificante (bps)	aa
Vps25	ESCRT-II	14-153	II	862	687	228
Vps2	SNF7	20-168	I	992	681	226
Vps20	SNF7	15-179	VIII	813	627	208
Vps24	SNF7	12-199	I	740	687	228
Vps32	SNF7	19-187	II	839	729	242
DidB	SNF7	9-184	VII	729	630	209
Vps60	SNF7	11-195	V	753	651	215
Vps4	MIT	6-74	VI	1482	1035	434
	AAA	167-351				
	Vps4 C	369-430				

Tabla CR.-2: Caracterización en *A.nidulans* de los componentes del ESCRT-III, sus proteínas accesorias DidB,

Se rastrearon las interacciones positivas usando como sistema de detección la expresión de β -galactosidasa y el crecimiento en medio selectivo de complementación de auxotrofías (crecimiento en “quadruple selection medium”, QSM). Algunas de las interacciones positivas detectadas ya habían sido descritas anteriormente entre proteínas de *S. cerevisiae*, como es el caso de las de Vps20 con Vps4^{77,81}, con Vps25^{47,190} y con Vps32¹⁹⁰, de la interacción de Did2 con Vps4¹⁹⁰ (verificada en *A. nidulans* por la Dra. Rodríguez-Galán¹⁸²), y de otras que han sido descritas más recientemente en levadura como la de Vps2 con Vps4^{82,245} (Figura CR.-5).

Dado que la maquinaria de los complejos ESCRT está conservada no sólo entre hongos, sino también en metazoos²⁴⁶, era de esperar que se detectaran interacciones ya descritas. No obstante, quiero hacer constar que, cuando se comprobó la interacción de Vps2 con Vps4, no existía evidencia publicada de esta interacción en ningún otro organismo. La interacción de Vps2 y Did2 con Vps4 es necesaria para que la proteína Vps4, que se encuentra en el citosol, sea reclutada a los endosomas^{82,87}

Un resultado negativo para una determinada pareja de interactores en 2H debe valorarse con precaución, ya que la fusión por la región N-terminal de las proteínas al DBD o al AD de Gal4 puede prevenir la capacidad interactiva de una cierta proteína como cebo o presa, según el caso. Por ejemplo, la proteína de fusión DBD::Vps4 es incompetente para interactuar cuando se usa como cebo, pero en cambio la proteína de fusión AD::Vps4 interactúa eficientemente con varios cebos (Tabla CR.-2 y Figura CR.-5). Por otra parte, con el sistema de vectores de 2H usado, la expresión de AD::Vps32 y AD::Vps20 es tóxica (en particular la expresión de AD::Vps20), lo que dificulta o incluso imposibilita el rastreo de interactores.

En conclusión, con las distintas combinaciones probadas se obtuvo al menos un cebo o una presa competente para cada una de las proteínas Vps candidatas a interactuar con PalC, a excepción de Vps60, que juega un papel relativamente menor en ESCRT-III⁵⁰.

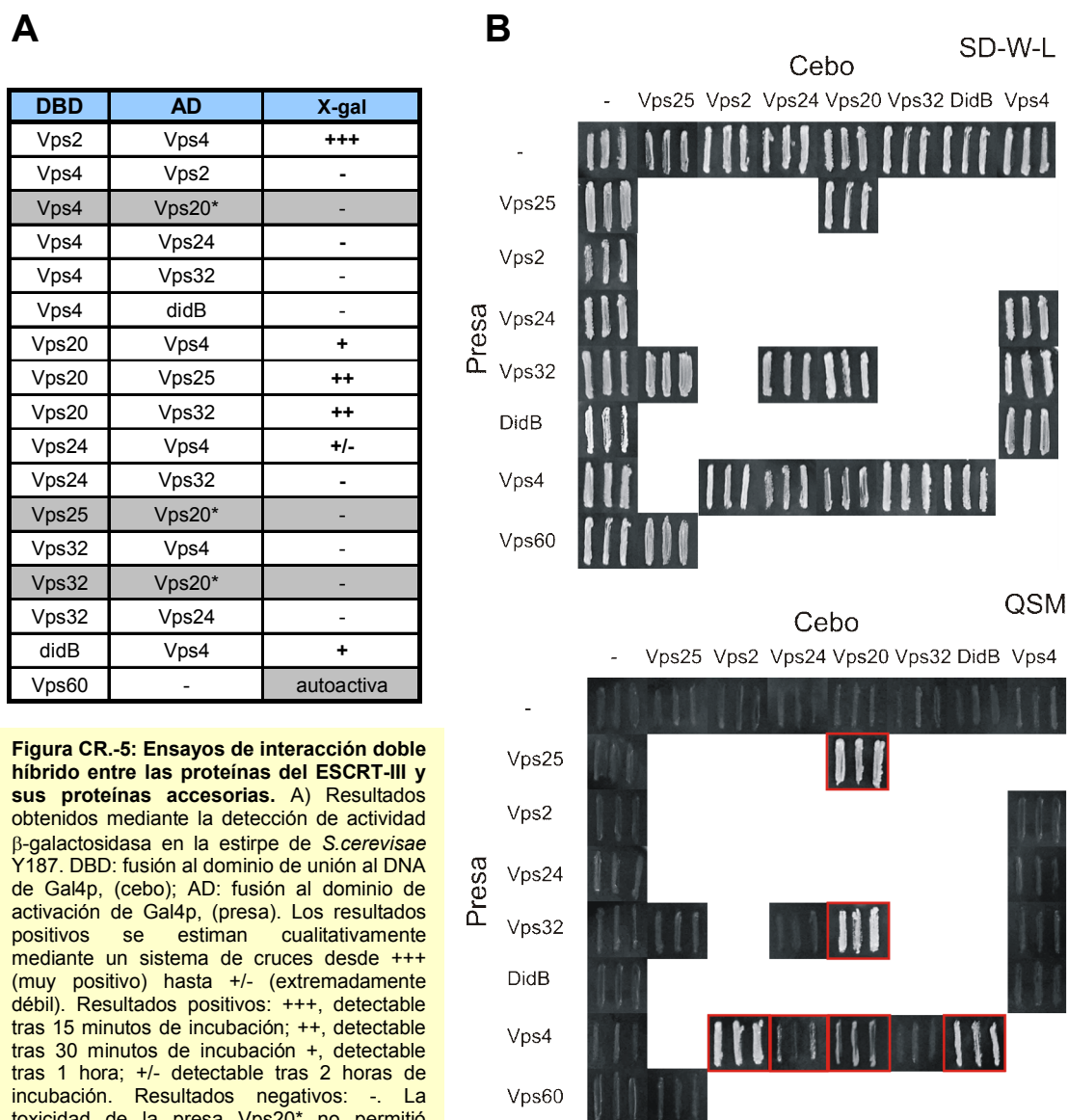


Figura CR.-5: Ensayos de interacción doble híbrido entre las proteínas del ESCRT-III y sus proteínas accesorias. A) Resultados obtenidos mediante la detección de actividad β -galactosidasa en la estirpe de *S.cerevisiae* Y187. DBD: fusión al dominio de unión al DNA de Gal4p, (cebo); AD: fusión al dominio de activación de Gal4p, (presa). Los resultados positivos se estiman cualitativamente mediante un sistema de cruces desde +++ (muy positivo) hasta +/- (extremadamente débil). Resultados positivos: +++, detectable tras 15 minutos de incubación; ++, detectable tras 30 minutos de incubación +, detectable tras 1 hora; +/- detectable tras 2 horas de incubación. Resultados negativos: -. La toxicidad de la presa Vps20* no permitió realizar un ensayo completamente definitivo (sombreado) B) Las interacciones entre los

cebos (DBD) y las presas (AD) se detectaron por el crecimiento de la estirpe AH109, transformada con los plásmidos correspondientes, en un medio sin Trp, sin Leu, sin His y sin adenina, (QSM, quadruple selection medium). El crecimiento en medio sin Trp y sin Leu (SD-W-L) indica que la distintas estirpes llevan los plásmidos para la expresión del cebo y la presa correspondiente. Los resultados positivos aparecen resaltados en rojo.

4.2.3 PalC INTERACCIONA EN DOBLE HÍBRIDO CON Vps32, Vps20 y Vps4

Para verificar la hipótesis de que PalC estuviera asociada a algún componente del ESCRT-III, se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido de manera sistemática con estas proteínas en todas las combinaciones (cebo/presa) posibles. Por otro lado, PalC se necesita para el procesamiento de PacC, y consideramos muy posible que en la transducción de señal de pH pueda interaccionar físicamente con alguno de los componentes de

la ruta *pal*. Por ello, también se intentó detectar interacción entre PalC y cada una de las otras cinco proteínas de la ruta *pal* y se construyeron los plásmidos necesarios para probar de forma sistemática cada una de las proteínas Pal como cebo y como presa. En el caso de PalH y PalI, se clonó en los vectores de 2H únicamente la secuencia codificante de las colas citoplásmicas (las regiones transmembranas de estas proteínas anclarían las proteínas de fusión a membranas, haciéndolas incompetentes).

Los resultados que obtuve en ensayos de 2H dirigido con los componentes del ESCRT-III demuestran que PalC interacciona con Vps32. La interacción se observa en ambos sentidos (con Vps32 fusionada al DBD o al AD). En los análisis cualitativos para la expresión de β -galactosidasa también se detectó una interacción fuerte con Vps20 (aunque en este caso no fue posible confirmar la interacción en uno de los sentidos debido a la aparente toxicidad de la proteína de fusión AD::Vps20), así como una interacción débil con Vps4. Además, mediante este mismo ensayo, se demostró que PalC interacciona débilmente consigo mismo (Figura CR.-6A y 8).

Estas interacciones de PalC son específicas, dado que no se observaron interacciones de 2H entre PalC y otras proteínas del ESCRT-III, como Vps2, Vps24, o DidB, ni tampoco con Vps25 del ESCRT-II (proteínas que son competentes como interactores de 2H con otros cebos o presas (Figura CR.-5). Además, el hecho de que Vps24, Vps2 y DidB tengan, al igual que Vps32 y Vps20, un dominio Snf7 y no interaccionen con PalC demuestra que PalC no se une, en este tipo de ensayos, de forma indiscriminada a cualquier proteína que contenga dicho dominio.

La detección de interacciones mediante inspección visual de la actividad β -galactosidasa en filtro gracias a la hidrólisis de X-gal es una prueba más sensible, en el sistema de 2H utilizado, que los ensayos de crecimiento en placas de QSM. Las estirpes de *S.cerevisiae* Y187 y AH109 utilizadas en 2H son auxótrofas para triptófano y para leucina, de manera que sólo pueden crecer en medios sin estos suplementos si están transformadas con los vectores de 2H. En el caso de la estirpe Y187, ésta lleva el transgén de *E.coli lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, bajo el control del promotor *GALI*, regulado positivamente por *GAL4^p*. Esto permite detectar las interacciones positivas usando sustratos de la β -galactosidasa como el X-Gal. La cepa AH109 es, además, auxótrofa para histidina y adenina. En este caso, la cepa expresa los genes *HIS3* y *ADE2* que complementan la auxotrofia para histidina y para adenina, respectivamente, regulados positivamente por *GAL4^p*. Por tanto, el crecimiento en medio sin histidina y sin adenina indica que la interacción es positiva (véase Material y Métodos). De las cuatro interacciones observadas con PalC, mediante la expresión de β -galactosidasa, las únicas que se detectaron claramente en placas de QSM fueron con Vps32 y con Vps20, lo que sugiere que dichas interacciones son particularmente fuertes (Figura CR.-6B). El crecimiento en placas con adenina pero sin histidina (“triple selection medium”, TSM) es mucho menos restrictivo y permite detectar interacciones débiles. En el caso de Vps4, no se detecta la interacción en QSM, pero sí se observa cierto crecimiento en TSM; en cambio la interacción de PalC consigo mismo, que se detecta débilmente en la tinción de X-gal, no permite el crecimiento ni en QSM ni en TSM (Figura CR.-6B).

A pesar de que las interacciones en 2H detectadas entre PalC y las tres proteínas Vps y consigo misma demuestran que PalC es competente como interactante de 2H, tanto como cebo o como presa, cuando se probó PalC

sistemáticamente con el resto de las proteínas de la ruta *pal* no se obtuvo ninguna combinación positiva (Figura CR.-6A).

A

DBD	AD	X-gal	DBD	AD	X-gal
PalC	PalA	-	PalA	PalC	-
PalC	PalB	-	PalB	PalC	-
PalC	PalC	muy débil	PalC	PalC	muy débil
PalC	PalF	-	PalF	PalC	-
PalC	PalH(349-760)	-	PalH(349-760)	PalC	autoactiva
PalC	PalI(175-550)	-	PalI(175-550)	PalC	-
PalC	Vps2	-	Vps2	PalC	-
PalC	Vps4	débil	Vps4	PalC	-
PalC	Vps20*	+(b)	Vps20	PalC	+
PalC	Vps24	-	Vps24	PalC	-
PalC	Vps25	-	Vps25	PalC	-
PalC	Vps32	+	Vps32	PalC	+
PalC	Vps46	-	Vps46	PalC	-
PalC	Vps60	-	Vps60	PalC	autoactiva

B

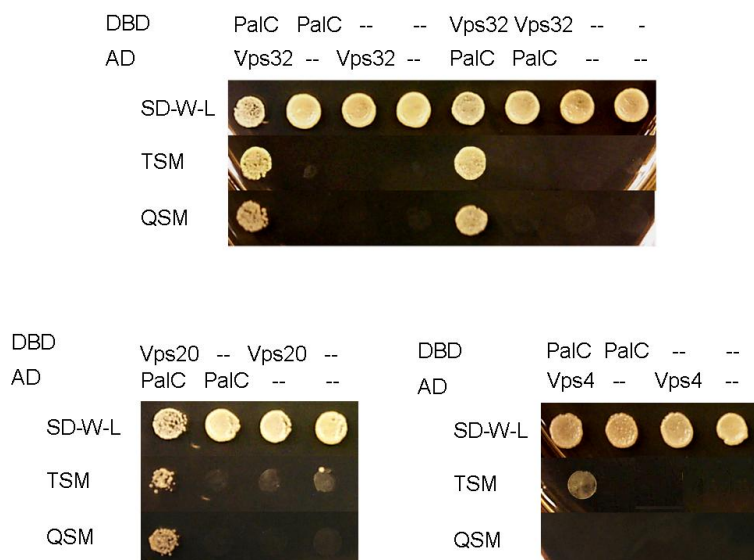


Figura CR.-6: Ensayos de doble híbrido dirigido de PalC contra los componentes de la ruta *pal* y las proteínas del MVB. A) Detección de la actividad β -galactosidasa en la cepa Y187. La proteína PalC se usó como cebo (DBD: dominio de activación de Gal4p) y como presa (AD: dominio de activación de Gal4p). Resultados: +, positivo detectable en 1 hora de incubación; débil, detectable tras dos horas de incubación; muy débil, detectable tras más de 2 horas de incubación; +^(b) la toxicidad de la presa Vps20 cuestiona la fiabilidad del resultado positivo. B) Crecimiento de la cepa AH109 transformada con los plásmidos que expresan PalC y Vps32, con los que expresan PalC y Vps20, y con los que expresan PalC y Vps4. En la figura se observa el crecimiento en medio QSM (-Trp, -Leu, -His, -Ade) y en medio TSM (-Trp, -Leu, -His, "triple selection medium"). Las condiciones en TSM son menos restrictivas y permiten el crecimiento en el caso de que la interacción sea débil. El crecimiento en medio SD-W-L (-Trp, -Leu) es el control de la transformación.

4.2.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS INTERACCIONES DE DOBLE HÍBRIDO DE PalC

Las diferencias observadas en el crecimiento en medio QSM de los transformantes de 2H, con las combinaciones de PalC y Vps32, Vps20, o Vps4, de alguna manera reflejan cualitativamente diferencias entre las distintas interacciones de 2H. Se procedió, pues, a determinar la actividad β -galactosidasa para obtener una indicación más aproximada de la fuerza relativa de cada una de las interacciones, teniendo en cuenta las reservas anteriormente mencionadas (Vps20 no puede utilizarse como presa debido a su aparente toxicidad y Vps4 es incompetente como cebo). Cuando se comparó la actividad β -galactosidasa de las combinaciones con PalC como presa, se observó que la interacción con el cebo Vps32 da valores que duplican los obtenidos con Vps20 (Figura CR.-7 Gráfico 2). Usando PalC como cebo (fusionado al DBD), se observó una notable diferencia entre la fuerte interacción medible entre PalC y Vps32, y la débil interacción de PalC con Vps4. Estos ensayos también confirmaron que la interacción de PalC consigo mismo es muy débil pero significativa (Figura CR.-7 Tabla).

Actividad β -galactosidasa		
DBD	AD	MEDIA
Vps32	PalC	5,3 \pm 0,3
PalC	Vps32	7,0 \pm 1,0
Vps32	-	0,1 \pm 0,0
-	Vps32	0,0 \pm 0,0
Vps20	PalC	2,8 \pm 0,6
Vps20	-	0,2 \pm 0,1
PalC	Vps4	1,0 \pm 0,4
-	Vps4	0,3 \pm 0,0
PalC	PalC	0,3 \pm 0,0
PalC	-	0,0 \pm 0,0
-	PalC	0,0 \pm 0,0
PalA	Vps32	8,3 \pm 1,5
PalA	-	0,0 \pm 0,0
Vps20	Vps32	17,7 \pm 2,9
DidB	Vps4	8,92 \pm 0,3

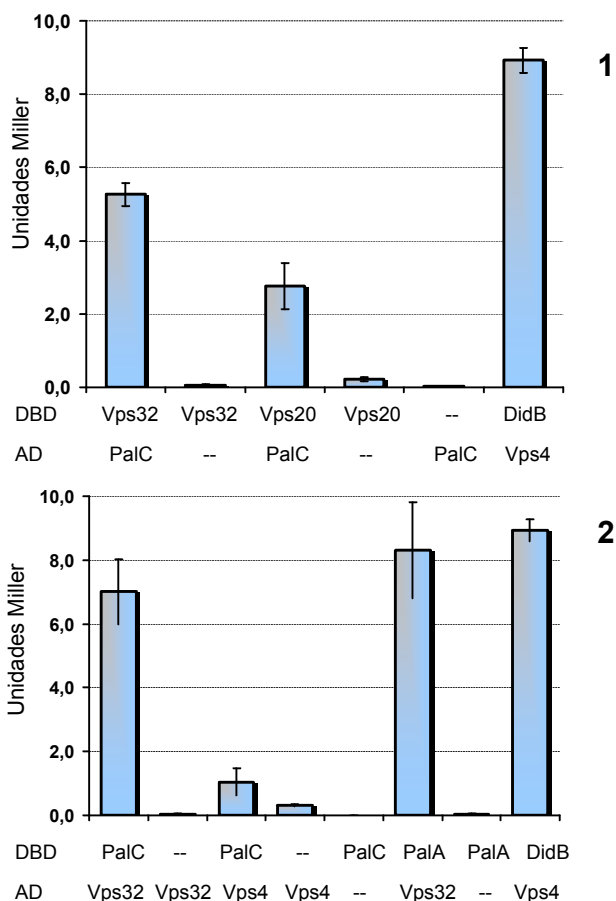


Figura CR.-7: Medida de la actividad β -galactosidasa de las interacciones de 2H que implican a PalC y a PalA. Determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa en la cepa Y187 transformada con los plásmidos correspondientes. La actividad se expresa en unidades Miller (media \pm error estándar). En la gráfica 1 se compara la actividad β -galactosidasa de las interacciones detectadas usando PalC como presa con la de la interacción de DidB con Vps4. En la gráfica 2 se compara la actividad β -galactosidasa de las interacciones detectadas usando PalC como cebo con la interacción de PalA con Vps32 y de DidB con Vps4. Las barras indican el error estándar.

Aunque en estos casos no se determinaron mediante western-blot los niveles de todos los cebos y presas empleados en los ensayos de 2H, dado que Vps20, Vps4 y PalC interaccionan fuertemente con Vps32, Vps2 y Vps32, respectivamente, la detección de interacciones más o menos fuertes o débiles con estas proteínas es muy probable que se deba a la afinidad de la interacción, y no a diferentes niveles de expresión y/o a la estabilidad de las distintas proteínas de fusión usadas como cebos o presas.

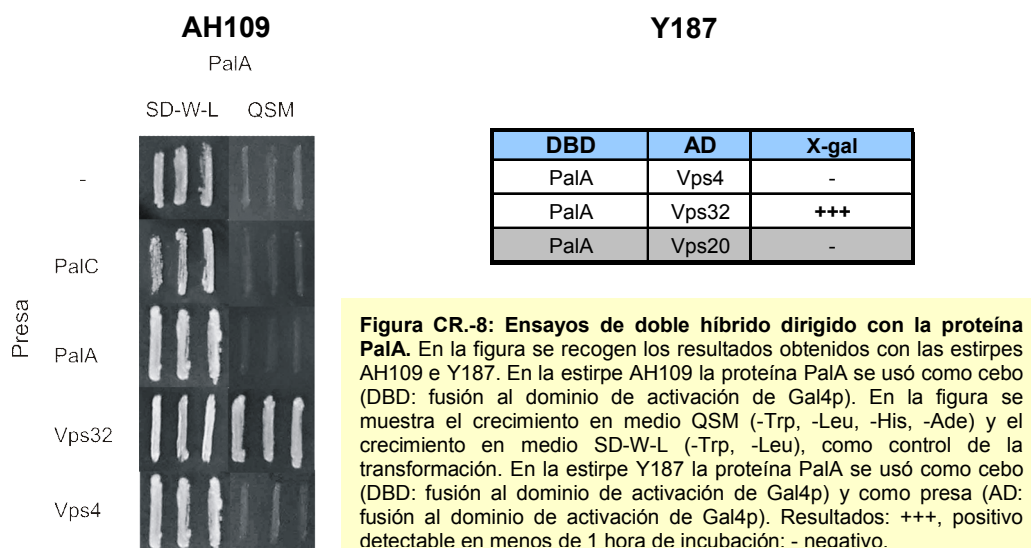
Se sabía que Vps20p interacciona directamente con Vps32p^{39,190} en el complejo ESCRT-III, y que Vps4p es un interactor indirecto de Vps32p^{115,247}, que a su vez interacciona con Vps2p^{190,245,248}, el cual es un interactor directo de Vps4p⁸². El hecho de que PalC interaccione con tres proteínas diferentes, y consigo misma, indica que PalC se une directamente a alguno, o a ambos, de los componentes del subcomplejo Vps20/Vps32 del ESCRT-III. Probablemente, el resultado débilmente positivo con Vps4 sea consecuencia de una interacción indirecta, en la cual las proteínas de la levadura actuarían como puente entre el cebo y la presa, ya que teniendo en cuenta la similitud de las proteínas de *A. nidulans* y *S. cerevisiae*, dada su cercanía filogenética, y la red de interacciones entre los componentes del ESCRT-III, se podría dar la formación de complejos heteroligoméricos entre las proteínas de *S. cerevisiae* y las proteínas de *A. nidulans*. Todo esto nos llevó a considerar que probablemente Vps32 sería un interactor directo de PalC en el ESCRT-III.

Otro dato que reforzó la conclusión de que la interacción de Vps32 con PalC es directa fue la comparación de la actividad β -galactosidasa correspondiente a las interacciones entre PalA y PalC con Vps32. En estos ensayos, se usó como control positivo la interacción DidB/Vps4, como paradigma de una interacción directa entre un componente del complejo ESCRT-III y una proteína accesoria^{82,84}. La interacción de PalC o PalA, como cebos con Vps32, dio valores similares a los de la interacción de DidB con Vps4 (Figura CR.-7 Gráfico 2) En el caso de PalA se había comprobado que la interacción con Vp32 es directa (*vide infra*).

PalA, al igual que PalC, tiene un dominio Bro1 e interacciona con Vps32, pero sólo es competente como interactor de doble híbrido cuando está fusionado al DBD¹⁰⁰. Por ello, utilizando como cebo PalA, se intentó comprobar si se detectaban resultados positivos con las presas Vps4 o Vps20 (Figura CR.-8). En la combinación de PalA con Vps4, tanto el cebo como la presa habían sido validados en otros experimentos y el resultado fue negativo (Figura CR.-7 Gráfico 2). En el caso de la interacción de PalA con Vps20, la presa Vps20 es tóxica. Aún así, en un intento de discriminar entre Vps20 y Vps32, se intentaron los ensayos de 2H de Vps20 con PalA o con PalC. Aunque los resultados no fueron concluyentes, dado que el número de transformantes obtenidos en los ensayos fue muy bajo, en el caso de PalC un 7% de los clones rastreados fueron positivos para la actividad β -gal. Sin embargo, estos clones crecían en medio sólido más rápido que el resto, lo que probablemente, se debe a la selección de mutaciones espúreas que disminuyen la toxicidad de la proteína de fusión. Por ello, y aunque PalA no dio lugar a ningún clon positivo para la actividad β -galactosidasa, no se consideraron estos datos suficientemente sólidos.

En cuanto a la débil interacción de PalC consigo misma, Kim et. al⁹⁶ señalan que el dominio Bro1 es un monómero en solución, aunque en el cristal aparece una asociación dimérica, lo que puede ser debido a interacciones cristalográficas. Además, la expresión en *E.coli* del dominio Bro1 de Alix, homólogo de PalA, da lugar a la aparición de dímeros, aunque la especie predominante sea la monomérica²⁴⁹. Esto explicaría la

interacción de PalC consigo misma. No obstante, no se puede descartar que, alternativamente, la interacción de 2H de PalC con PalC esté mediada por Vps32 de *S. cerevisiae*.



Por lo tanto, en función de la fuerza relativa de cada una de las interacciones detectadas con PalC, podemos concluir que, probablemente, la interacción con Vps32 sea directa, mientras que, posiblemente, la interacción con Vps4 y la interacción consigo misma sea indirecta. En el caso de Vps20 su interacción con PalC es relativamente fuerte y podría tratarse de una interacción directa, aunque también podría estar mediada por la proteína Vps32 de *S. cerevisiae*, dado que la unión de Vps20 con Vps32 es muy fuerte.

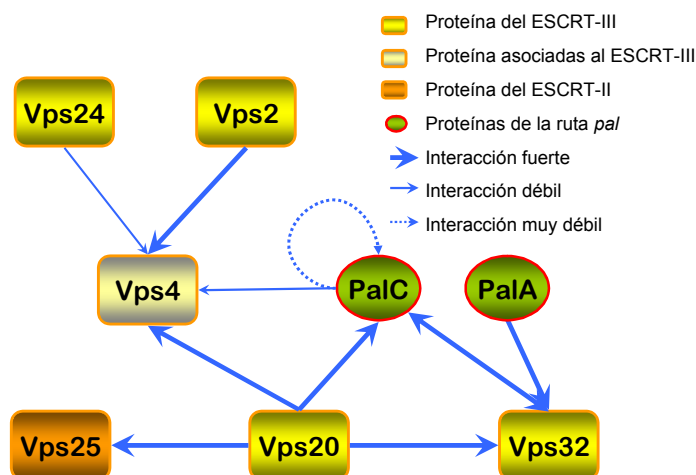


Figura CR-9: Esquema general de las interacciones detectadas usando el sistema de doble híbrido.

En resumen, de los cuatro componentes de la ruta *pal* que no tienen regiones transmembrana en su secuencia, PalA y PalC interactúan en 2H con Vps32 (Figura CR.-9), y PalB interactúa con otro componente del ESCRT-III, Vps24¹¹⁶. En cambio, PalF interactúa fuertemente con la cola citoplásmica de PalH¹⁸⁰, pero, al contrario que con PalC, no se han detectado interacciones de PalH con ninguno de los componentes del ESCRT-III mediante doble híbrido (Tabla CR.-3).

DBD	AD	X-gal	DBD	AD	X-gal
PalF	PalA	-	PalA	PalF	-
PalF	PalB	-	PalB	PalF	-
PalF	PalC	-	PalC	PalF	-
PalF	PalF	-	PalF	PalF	-
PalF	PalH(349-760)	+	PalH(349-760)	PalF	autoactiva
PalF	Vps4	-	Vps4	PalF	-
PalF	Vps20	-	Vps20	PalF	-
PalF	Vps24	-	Vps24	PalF	-
PalF	Vps25	-	Vps25	PalF	-
PalF	Vps32	-	Vps32	PalF	-
PalF	didB	-	didB	PalF	-

Tabla CR.-4: PalF no interactúa en doble híbrido ni con PalC, ni con PalA, ni con ningún componente del ESCRT-III.
A) Ensayos de doble híbrido dirigido en la cepa de *S.cerevisiae* Y187 con las combinaciones que aparecen indicadas en la tabla. DBD: fusión al dominio de unión al DNA de GAL4 (cebo); AD: fusión al dominio de activación de GAL4 (presa). La tinción de X-gal en filtro para comprobar si existe actividad β -galactosidasa indica si existe interacción (+) o no (-).

4.2.5 SUSTITUCIONES Y DELECCIONES DE UN ÚNICO AMINOÁCIDO PREVIENEN LA UNIÓN DE PalC CON Vps32

Los datos del análisis mutacional de PalC¹³⁵ y la similitud con el dominio Bro1 de Bro1p con PalC se utilizaron para el mapeo de la región de PalC implicada en la unión a Vps32. Para ello se analizó el efecto de sustituciones de los residuos Ile188, Arg442, Pro439 y Tyr451 de PalC en su interacción de 2H con Vps32.

Dentro la superficie hidrofóbica (“patch 1”) (Figura CR.-3, región conservada I), por la que interactúa Bro1p con Vps32p, se encuentran los residuos Ile144 y Leu336. Las sustituciones Ile144Asp y Leu336Asp previenen la unión de Bro1 a Vps32⁹⁶. Como hemos señalado anteriormente, los residuos en PalC que se corresponden con la Ile144 y Leu 336 de Bro1p son Ile188 y Leu438, respectivamente. Mutantes con sustituciones en PalC en residuos adyacentes o próximos a la Leu438 (Pro439 y Arg442) son fenotípicamente mutantes de pérdida de función. Las estirpes con la delección del residuo Arg442 tienen un fenotipo de pérdida total de función (crecimiento nulo a pH 8), mientras que los mutantes con las sustituciones Pro439Phe y Arg442His tienen un fenotipo de pérdida parcial de función. Lo mismo sucede con el cambio Tyr451Asp, que provoca la pérdida parcial de función de PalC. Esta Tyr451 resulta interesante ya que se encuentra en el borde C-terminal de lo que hemos definido arbitrariamente como dominio Bro1 en PalC, dentro de una región rica en prolinas. Por esto, se introdujeron en la proteína de fusión Gal4^{AD}::PalC las sustituciones Pro439Phe, Arg442His

y la delección Arg442Δ. Además, para intentar exacerbar el efecto que pudieran tener las sustituciones en Arg442 y en Tyr451, se construyeron plásmidos de 2H para expresar Gal4^{AD}::PalC con los cambios Arg442Ala y Tyr451Ala. En lo que se refiere al residuo Ile188, no existían mutaciones en *palC*, entre las aisladas por genética clásica, que afectasen dicho codón, por lo que probamos en 2H la sustitución a aspártico, dado que la sustitución del residuo correspondiente en Bro1p y en Alix elimina la interacción de estas proteínas con Vps32p⁹⁶ y CHMP4, respectivamente²⁴⁹.

Además, para comprobar si el dominio Bro1 es necesario y suficiente para la interacción con Vps32, se analizó el efecto de truncamientos C-terminales dentro y fuera de lo que habíamos definido como dominio Bro1 en PalC. Se construyeron dos presas mutantes PalC(1-427) y PalC(1-454). El truncamiento tras el residuo 427 de PalC delecciona 18 residuos de la región C-terminal del hipotético dominio Bro1, y el correspondiente mutante tiene un fenotipo de pérdida total de función¹³⁵. En cambio, la proteína truncada en el residuo 454 incluye el dominio Bro1 entero y el mutante correspondiente tiene un fenotipo de pérdida parcial de función.

Por último, se consideró que las sustituciones Phe15Ser y Gly321Asp en PalC podrían resultar informativas. Las estirpes mutantes con estas sustituciones, obtenidas por mutagénesis clásica, tienen un fenotipo de pérdida total de función¹³⁵. Los residuos Phe15 y Gly321 se encuentran en regiones conservadas pero se alinean con residuos en Bro1p fuera del sitio de interacción con Vps32, “patch 1”, por lo que estos residuos no deberían afectar, *a priori*, a la interacción de PalC con Vps32.

Comprobamos mediante western-blot los niveles estacionarios de las diferentes presas en *S.cerevisiae*. Los niveles de las presas PalC mutantes fueron similares a los niveles de la proteína silvestre, salvo en los casos de PalC(1-427), PalC(1-454), PalC^{F15S} y PalC^{G321D}, en los que el nivel de la proteína de fusión era menor que en el silvestre, por lo que los resultados obtenidos con estas presas deben tomarse con reserva, ya que no se puede distinguir un efecto genuino de los truncamientos, o de las sustituciones, en la interacción de un efecto debido a los bajos niveles de presa (Figura CR.-10A). Niveles similares a la presa silvestre indican que las mutaciones en PalC no afectan drásticamente al plegamiento de la proteína y que la estabilidad de las presas PalC mutantes es parecida a la de la silvestre. Tanto las pruebas de crecimiento en QSM como los análisis de β-galactosidasa de los ensayos de 2H mostraron que todas las sustituciones y la delección afectan negativamente a la interacción de PalC con Vps32 (Figura CR.-10B y 10C). Las sustituciones Arg442Ala y Arg442His disminuyen, pero no previenen, la interacción. En cambio, las sustituciones Pro439Phe, Tyr451Ala, Ile188Asp y la delección Arg442Δ eliminan totalmente la interacción (Figura CR.-10 B y C).

Cabe destacar que las sustituciones Arg442Ala y Arg442His dieron lugar a una actividad β-galactosidasa en el ensayo de 2H de un 18% y un 11%, respectivamente, de la actividad que se detecta con la proteína silvestre (Figura CR.-10 C). Por el contrario, no se detectó actividad β-galactosidasa en las cepas con la sustitución Arg442Δ, a pesar de que la expresión y estabilidad de las presas PalC^{R442A}, PalC^{R442H} y PalC^{R442Δ} es similar (Figura CR.-10A.). Por tanto, las diferencias detectadas entre las sustituciones Arg442His y Arg442Δ en la interacción de 2H se correlacionan con el efecto fenotípico que los correspondientes alelos mutantes tienen en *A. nidulans*, pérdida parcial de función en el caso de Arg442His, y pérdida completa de función en el caso de

Arg442Δ. En conjunto, estos datos indican que la interacción de PalC con Vps32 es específica e involucran a las regiones conservadas donde se localizan los residuos Arg442, Pro439, y posiblemente, Tyr451, como posibles candidatas a mediar dicha especificidad. La región de Bro1 que se corresponde con la región donde se localiza la Tyr451 está fuera de la estructura cristalográfica. No obstante, como se ha señalado anteriormente, la Pro439 y la Arg442 están dentro de una región que en Bro1p está involucrada en la unión a Vps32p.

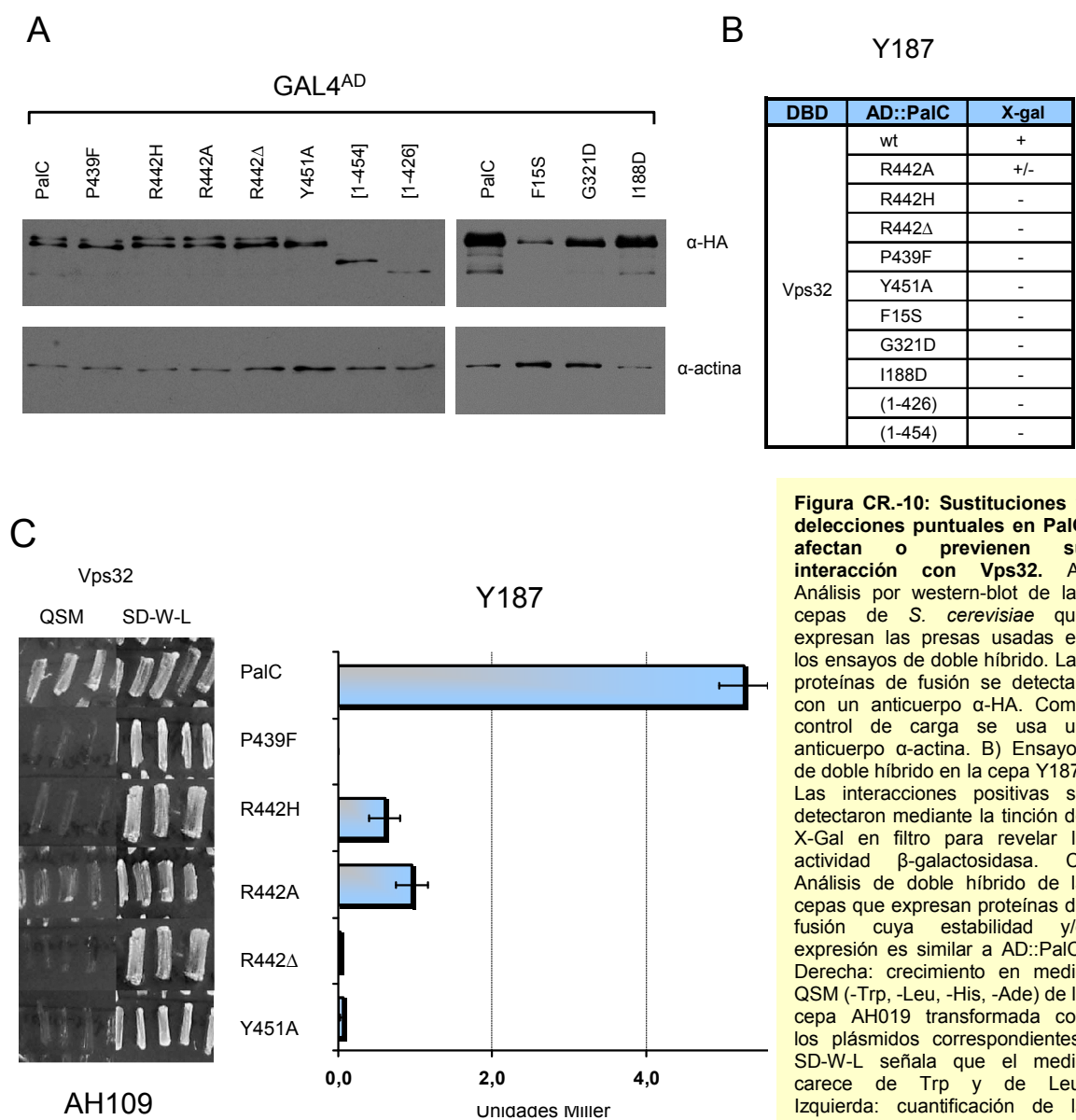


Figura CR.-10: Sustituciones y deleciones puntuales en PalC afectan o previenen su interacción con Vps32. A) Análisis por western-blot de las cepas de *S. cerevisiae* que expresan las presas usadas en los ensayos de doble híbrido. Las proteínas de fusión se detectan con un anticuerpo α-HA. Como control de carga se usa un anticuerpo α-actina. B) Ensayos de doble híbrido en la cepa Y187. Las interacciones positivas se detectaron mediante la tinción de X-Gal en filtro para revelar la actividad β-galactosidasa. C) Análisis de doble híbrido de la cepas que expresan proteínas de fusión cuya estabilidad y/o expresión es similar a AD::PalC: Derecha: crecimiento en medio QSM (-Trp, -Leu, -His, -Ade) de la cepa AH019 transformada con los plásmidos correspondientes. SD-W-L señala que el medio carece de Trp y de Leu. Izquierda: cuantificación de la actividad β-galactosidasa en unidades Miller. Las barras indican el error estándar.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE PalC CON Vps32

4.3.1 PalC ES UN INTERACTOR DIRECTO DE Vps32

Para determinar si la interacción de PalC con Vps32 detectada por doble híbrido es directa, y eliminar la posibilidad de que la fusión en el extremo N-terminal de los dominios Gal4p de unión al DNA o de activación, alteren las propiedades de Vps32 o PalC, dando lugar a una interacción espúrea, se recurrió a ensayos de “pull-down” *in vitro*. Para realizar estos ensayos se usó como cebo la proteína PalC fusionada por su extremo amino terminal a la glutatión S-transferasa (GST) y como presa la proteína de fusión ZZ-Vps32 [ZZ hace referencia a una repetición en tándem del dominio de unión a la inmunoglobulina G (IgG), Z, de la proteína A]. Se mezclaron los extractos bacterianos que expresaban estas proteínas de fusión y se incubaron en presencia de resina de glutatión-Sepharosa. El análisis de las proteínas unidas a la resina por SDS-PAGE demostró que ZZ::Vps32 copurifica con GST::PalC (Figura CR.-11A, carril 5). Por el contrario, otras proteínas de *A. nidulans* no relacionadas, como KapA⁵⁰ (Figura CR11A, carril 6) o, como se verá más adelante, la proteína Vps25 del complejo ESCRT-II, no copurifican con GST::PalC. KapA es la importina- α de *A.nidulans*. En la proteína KapA⁵⁰ el dominio autoinhibitorio de unión a la importina β (IBB) se ha deleccionado, lo que permite que KapA⁵⁰ se una a la NLS de la proteína ensambladora del nucleosoma NapB²⁵⁰. ZZ::KapA⁵⁰ copurifica con GST::NapB²⁵⁰ (Figura CR.-11A, carril 8). ZZ::Vps32 no copurifica con GST::NapB (Figura CR.-11A, carril 7), lo que demuestra que ZZ::Vps32 no se une inespecíficamente a cualquier cebo. Por tanto, se puede concluir que PalC interacciona específicamente y de forma directa con Vps32.

En los ensayos de “pull-down”, la subida en la concentración de Triton X-100 del 0.05% al 0.5% no afectó a la interacción (Figura CR.-11C), que es también relativamente resistente al incremento de la fuerza iónica, ya que GST::PalC interacciona con ZZ::Vps32 cuando la concentración de NaCl en el ensayo fue igual o inferior a 0,3M y sólo cuando la concentración de NaCl se elevó a 0,5 M se eliminó la interacción (Figura CR.-11D).

La interacción de Bro1p con Vps32p está mediada por un parche de residuos hidrofóbicos (“patch1”) ⁹⁶. En las estructuras tridimensionales de los complejos que forma el dominio Bro1 de Alix con las α -hélices C-terminales de CHMP4A, CHMP4B o CHMP4C (homólogos humanos de Vps32), los contactos principales se deben a interacciones entre residuos hidrofóbicos ²⁰⁰. Estos trabajos aportan una explicación satisfactoria a por qué el aumento moderado en la concentración de sal no previene la interacción GST::PalC con ZZ::Vps32.

Por otra parte, Vps32p y las proteínas CHMP4 son proteínas con motivos “coiled-coil” en su secuencia, con una región N-terminal cargada positivamente ^{39,251}. Además, se ha comprobado que CHMP4 homopolimeriza formando filamentos ⁷⁶. Por tanto, aunque GST::PalC sea capaz de retener a ZZ::Vps32, al aumentar la concentración de ZZ::Vps32 durante el “pull-down”, la proteína de fusión ZZ::Vps32 podría polimerizar y formar agregados que interaccionasen de forma inespecífica con la matriz. Para descartar esta posibilidad y comprobar que efectivamente toda la proteína ZZ::Vps32 retenida lo hace a través de la unión a GST::PalC, se eluyó el material unido a la matriz de glutatión-Sepharosa con glutatión reducido (GSH). Con este tratamiento,

RESULTADOS – Capítulo I

GST::PalC y ZZ::Vps32 coeluyeron de la matriz (Figura CR.-11B), y tan sólo una pequeña fracción de cada proteína quedó retenida en la columna. El análisis cuantitativo de las bandas que aparecen en los geles de SDS-PAGE indicó que las proteínas eluyen en una proporción de 0,9 moles de ZZ-Vps32 por mol de GST::PalC (*vide infra*). Por lo tanto, la interacción entre PalC y Vps32 es una interacción genuina con una estequiometría aproximada de 1:1.

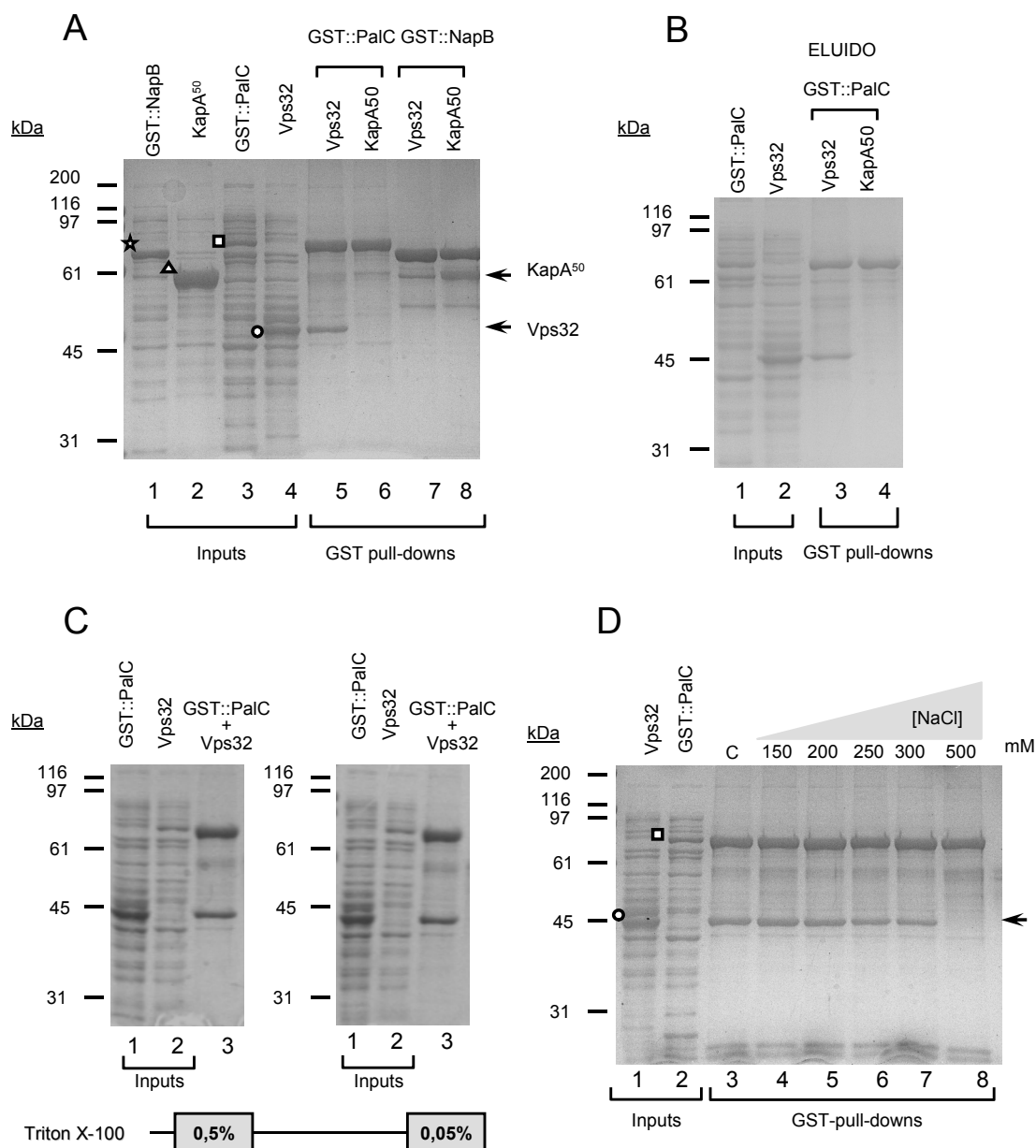
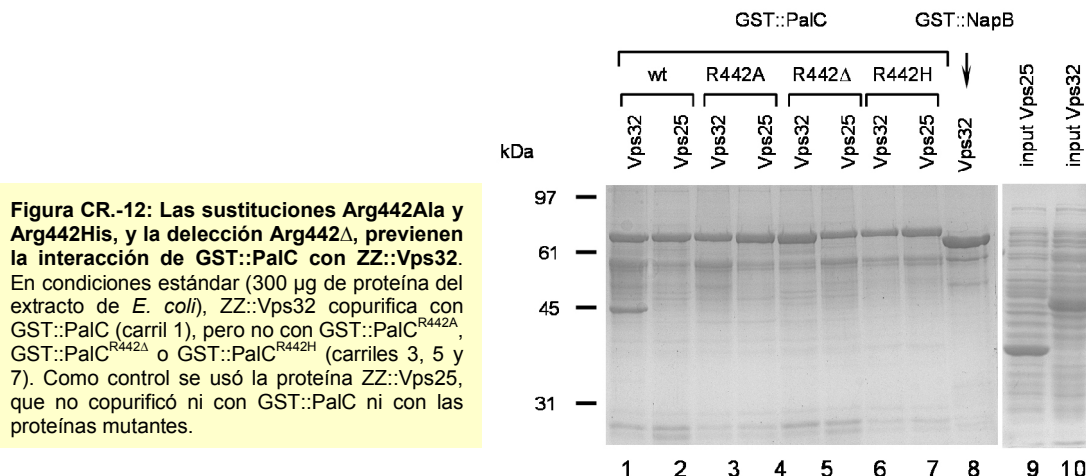


Figura CR.-11: PalC interacciona directamente con Vps32. A) ZZ::Vps32 copurifica con GST::PalC (carril 5). Se mezclaron los extractos bacterianos que expresaban las proteínas de fusión y se incubaron en presencia de perlas de glutatión-Sepharosa. Las bandas correspondientes a la proteínas sobreexpresadas en *E. coli* aparecen señaladas (figuras geométricas), mientras que la flecha negra indica la banda de ZZ::Vps32 que queda retenida en la resina por GST::PalC. B) Elución de GST::PalC y ZZ::Vps32 de la matriz de glutatión sepharosa (carril 3). C) El Triton X-100 no afecta a la interacción de GST::PalC con ZZ::Vps32 D) La interacción de GST::PalC con ZZ::Vps32 resiste una concentración de NaCl de hasta 300 mM (carril 7) pero desaparece cuando la concentración de NaCl se eleva a 500 mM (carril 8). En el carril 3 (C, “control”) se usó una concentración de NaCl 200 mM, que es la concentración estándar usada en los experimentos de A, B y C. Las proteínas que se unen a la resina de glutatión-Sepharosa se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie. Los “inputs” representan un 5% de la proteína total empleada en los ensayos.

Por otra parte, Vps32p y las proteínas CHMP4 son proteínas con motivos “coiled-coil” en su secuencia, con una región N-terminal cargada positivamente ^{39,251}. Además, se ha comprobado que CHMP4 homopolimeriza formando filamentos ⁷⁶. Por tanto, aunque GST::PalC sea capaz de retener a ZZ::Vps32, al aumentar la concentración de ZZ::Vps32 durante el “pull-down”, la proteína de fusión ZZ::Vps32 podría polimerizar y formar agregados que interaccionasen de forma inespecífica con la matriz. Para descartar esta posibilidad y comprobar que efectivamente toda la proteína ZZ::Vps32 retenida lo hace a través de la unión a GST::PalC, se eluyó el material unido a la matriz de glutatión-Sepharosa con glutatión reducido (GSH). Con este tratamiento, GST::PalC y ZZ::Vps32 coeluyeron de la matriz (Figura CR.-11B), y tan sólo una pequeña fracción de cada proteína quedó retenida en la columna. El análisis cuantitativo de las bandas que aparecen en los geles de SDS-PAGE indicó que las proteínas eluyen en una proporción de 0,9 moles de ZZ-Vps32 por mol de GST::PalC (*vide infra*). Por lo tanto, la interacción entre PalC y Vps32 es una interacción genuina con una estequiometría aproximada de 1:1.



No obstante, como prueba adicional de que la interacción es directa, se construyeron plásmidos para expresar proteínas de fusión GST::PalC mutantes que llevasen las mismas sustituciones y delecciones usadas en los ensayos de 2H. Al expresar en *E.coli* estas proteínas, tan sólo la solubilidad de GST::PalC^{R442A}, GST::PalC^{R442H} y GST::PalC^{R442Δ} fue suficiente para realizar los experimentos de pull-down in vitro. Cuando se realizó el experimento en condiciones standard (con 300 µg de proteína de extracto de GST::PalC y 300µg del extracto ZZ::Vps32) las tres mutaciones previnieron la unión con ZZ::Vps32 (Figura CR.-12). Sin embargo, en el

caso de GST::PalC^{R442A}, cuando se incrementó 2,6 veces la cantidad de GST::PalC^{R442A}, una proporción detectable de la proteína ZZ::Vps32 copurificó con GST::PalC^{R442A} (Figura CR.-12A, carril 3). Mientras que con el cebo silvestre se recuperaron 0,9 moles de Vps32 por mol de PalC, con el cebo mutante tan sólo se recuperaron 0,13moles (Figura CR.-13B). Se demostró también que, ZZ::Vps32 no copurifica con GST::PalC^{R442A} debido a interacciones inespecíficas, como consecuencia del aumento de la cantidad del cebo, sino que lo hace mediante una interacción específica, como lo demuestra el hecho de que ZZ::Vps25 no copurifica con GST::PalC^{R442A} en ninguna de las condiciones (Figura CR.-12, carril 4 y Figura CR.-13A, carril 5).

Hay que señalar que esta pérdida “parcial” de unión a Vps32 se correlaciona con los resultados obtenidos en 2H, que demostraron que la sustitución Arg442Ala en PalC disminuye la eficiencia de la interacción (Figura CR.-10). En conjunto, los datos obtenidos de estos análisis corroboran que la interacción entre PalC y Vps32 es específica, y señalan que la región conservada I de PalC juega un papel clave en la interacción.

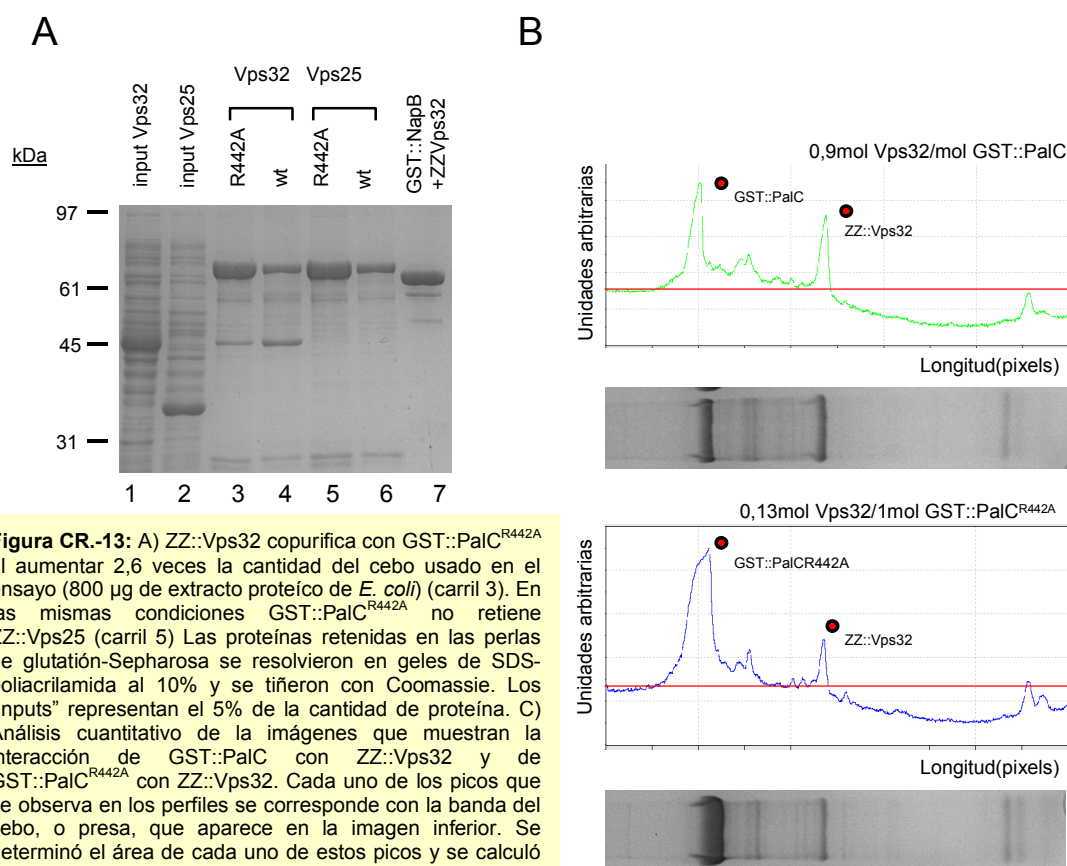


Figura CR.-13: A) ZZ::Vps32 copurifica con GST::PalC^{R442A} al aumentar 2,6 veces la cantidad del cebo usado en el ensayo (800 µg de extracto proteico de *E. coli*) (carril 3). En las mismas condiciones GST::PalC^{R442A} no retiene ZZ::Vps25 (carril 5). Las proteínas retenidas en las perlas de glutatión-Sepharosa se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie. Los “inputs” representan el 5% de la cantidad de proteína. C) Análisis cuantitativo de las imágenes que muestran la interacción de GST::PalC con ZZ::Vps32 y de GST::PalC^{R442A} con ZZ::Vps32. Cada uno de los picos que se observa en los perfiles se corresponde con la banda del cebo, o presa, que aparece en la imagen inferior. Se determinó el área de cada uno de estos picos y se calculó la relación que hay entre el cebo y la presa, teniendo en cuenta la masa molecular de cada proteína.

4.3.2 PalA ES LA SEGUNDA DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA *pal* QUE UNE DIRECTAMENTE A Vps32

PalA tiene un dominio Bro1, y GST::Vps32 copurifica con la proteína PalA(1-798) expresada in vitro mediante el sistema TNT (Figura CR.-14 A), lo que demuestra que la interacción es directa. PalA(1-798) carece de los 53 residuos C-terminales de PalA, pero mantiene el dominio Bro1 intacto. El primer paso para comprender por qué PalA y PalC, dos proteínas distintas que participan en la misma ruta, interaccionan con el mismo componente del ESCRT-III, era comparar las características de su unión a Vps32.

El nivel de expresión de GST::Vps32 en *E.coli* es relativamente alto. Sin embargo, parte de la proteína es insoluble, y cofracciona con los restos celulares. El hecho de que Vps32 polimerice, unido a la capacidad de la GST de dimerizar, puede facilitar que la proteína de fusión forme agregados, por lo que, para reforzar la conclusión de que Vps32 y PalA interaccionan directamente, se repitieron los experimentos de afinidad, usando como cebo la proteína de fusión GST::PalA(1-798).

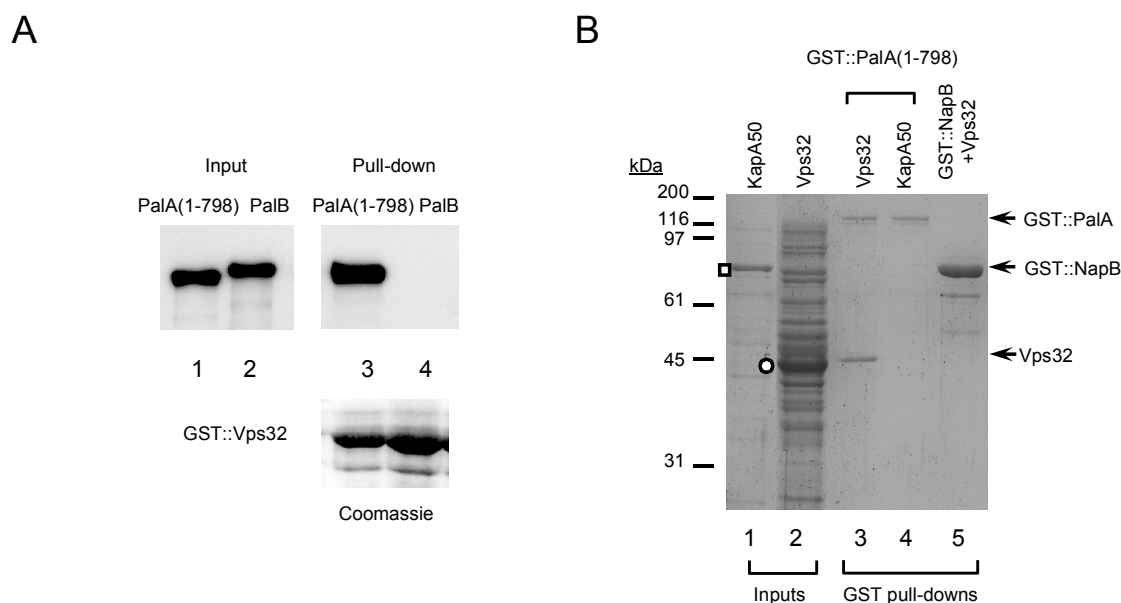


Figura CR.-14: PalA interacciona directamente con Vps32. A) Perlas de glutatión-Sepharosa precargadas con la proteína GST::Vps32 se incubaron con ^{35}S -PalA¹⁻⁷⁹⁸ y con ^{35}S -PalB. Las proteínas que se unieron a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Las proteínas ^{35}S se detectaron por autorradiografía (carriles 3 y 4, arriba) y el cebo GST::Vps32 por tinción con Coomassie (carriles 3 y 4, abajo). Inputs: 2% de la proteína empleada en el ensayo. B) GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ copurifica con ZZ::Vps32, pero no con ZZ::KapA50. Extractos proteicos con ZZ::Vps32 y ZZ::KapA⁵⁰ se incubaron con GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ junto con perlas de glutatión-Sepharosa. GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ y ZZ::Vps32 eluyen de la resina con 15 mM GSH. Las bandas correspondientes a las proteínas fusionadas al dominio ZZ se indican con un círculo en el caso de ZZ::vps32, y con un cuadrado en el caso de ZZ::KapA⁵⁰, mientras que las flechas negras señalan la movilidad electroforética de las proteínas GST::PalA, GST::NapB y ZZ::Vps32. Las proteínas unidas a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie. Los "inputs" representan un 5% de la proteína total empleada en los ensayos.

En ensayos de “pull-down” con cebos GST, GST::PalA(1-798) copurificó con ZZ::Vps32, pero no con ZZ::KapA⁵⁰ (Figura CR.-14 B, carriles 3 y 4 respectivamente) de manera similar a lo que ocurre con GST::PalC, pero en el caso de PalA la estequiometría de la interacción no es 1:1, sino que se unen ~ dos moléculas de ZZ::Vps32 por molécula de GST::PalA(1-798) (1,9 moles de ZZ::Vps32, aproximadamente, por mol de GST::PalC) (Figura CR.-15 B). Además, la interacción de PalA(1-798) con Vps32 es más resistente a la fuerza iónica que la de PalC con Vps32. Con una concentración de NaCl de 0,5M en el tampón empleado en el ensayo de pull down, que previene la interacción de Vps32 con PalC, se detectó claramente la interacción con PalA (Figura CR.-15 A).

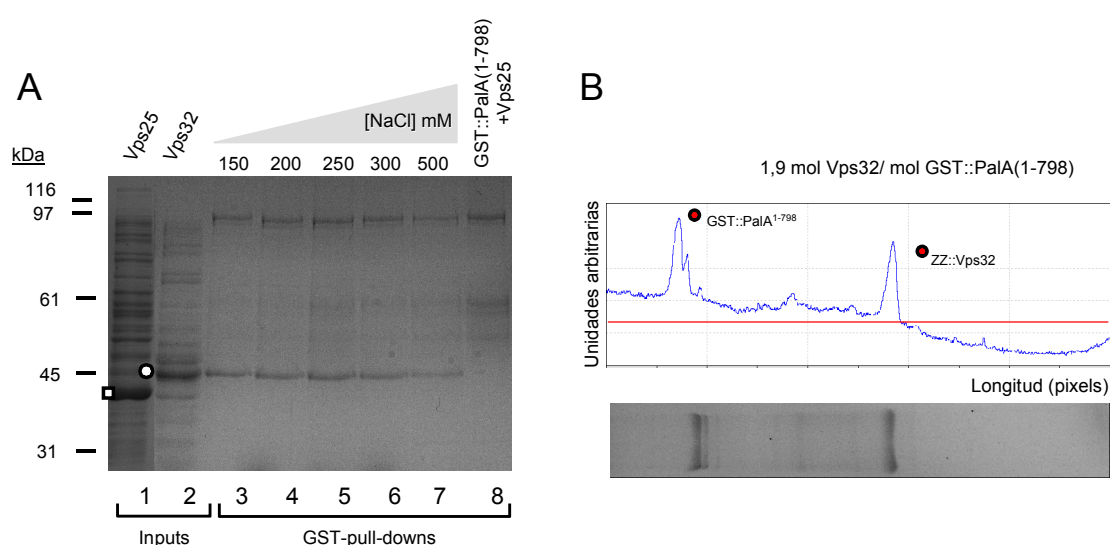


Figura CR.-15: Caracterización de la interacción con de PalA con Vps32. A) La interacción de GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ con ZZ::Vps32 (círculo) resiste a 500 mM NaCl; sin embargo, GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ no une ZZ::Vps25 (cuadrado). Se mezclaron los extractos bacterianos que expresaban las proteínas de fusión y se incubaron en presencia de perlas de glutatión-Sepharosa. Las proteínas unidas a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie. Los “inputs” representan un 5% de la proteína total empleada en los ensayos. B) Análisis cuantitativo de una imagen que muestra la interacción de GST::PalA¹⁻⁷⁹⁸ con ZZ::Vps32. Los picos que se observan en el perfil se corresponden con las bandas del cebo o presa que aparece en la imagen inferior. Se determinó el área de cada uno de estos picos y se calculó la relación que hay entre el cebo y la presa, teniendo en cuenta la masa molecular de cada proteína.

Por lo tanto, PalC y PalA unen directamente a Vps32. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que PalA o, especialmente, PalC (*vide supra*) no sólo interaccionen directamente con Vps32 sino que lo hagan también con Vps20, y que sea esta interacción la que determine su papel en la ruta de transducción de la señal de pH. Lamentablemente, la escasa solubilidad de Vps20 en *E.coli* no permitió estudiar esta posibilidad mediante ensayos de pull-down *in vitro*, pero si se demostró que ni ZZ::Vps2, ni ZZ::Vps24 copurifican con GST::PalC en ensayos de pull-down con perlas de glutatión-Sepharosa (Figura CR.-16).

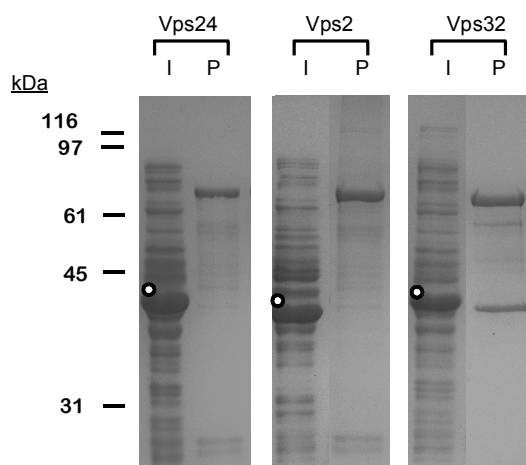


Figura CR.-16: PalC no interacciona con proteínas con dominio SNF7, a excepción de Vps32. Ensayos de “pull-down” de GST::PalC con la proteínas ZZ::Vps indicadas (I: “inputs”, P: “pull-down”). La banda correspondiente a la proteína fusionada al dominio ZZ se indica con un círculo. Las proteínas unidas a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Coomassie

4.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalC

En los trabajos realizados sobre la localización de las proteínas de la ruta *pal* se había demostrado que PalI y PalH se localizan en la membrana plasmática¹³⁶, mientras que en *S. cerevisiae* Rim20p, el homólogo de PalA, se asocia a los complejos ESCRT en los endosomas a través de Vps32¹⁸¹. Estos resultados pusieron de manifiesto que la ruta de transducción de la señal de pH está organizada en dos complejos multiproteicos distintos: un complejo situado en la membrana plasmática y otro asociado a la membrana del endosoma¹³⁷. Su capacidad de interacción con Vps32 situaba, *a priori*, a PalC en el complejo asociado al endosoma.

4.4.1 CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalC EN FUNCIÓN DEL PH AMBIENTAL

Para estudiar la localización de PalC se generaron estirpes con transgenes que expresan PalC etiquetada con GFP en sus extremos N- o C-terminal, bajo el control del promotor del gen *alcA* (“alcohol deshidrogenasa”), un promotor fuerte, regulable por fuente de carbono, que se induce por etanol y se reprime por glucosa. La construcción se integró en el locus *argB* y se seleccionaron los transformantes que llevaban una única copia del transgén mediante Southern-blot (Figura CR-17).

La fusión de la proteína GFP al extremo N-terminal de PalC imposibilita su función, como demuestra el hecho de que el transgén, en condiciones de inducción, no complementa la mutación *palC4*, ya que las estirpes con este transgén no pueden crecer a pH alcalino (datos no mostrados). En cambio, en condiciones de inducción del promotor *alcA*, las cepas *palC4* con el transgén que codifica la proteína PalC con la GFP en su extremo C-terminal tienen un fenotipo de crecimiento en placa indistinguible de una cepa silvestre en el que se expresa PalC de manera análoga (*vide infra*). Por tanto, se eligieron las cepas que expresaban PalC::GFP para las observaciones por microscopía de epifluorescencia.

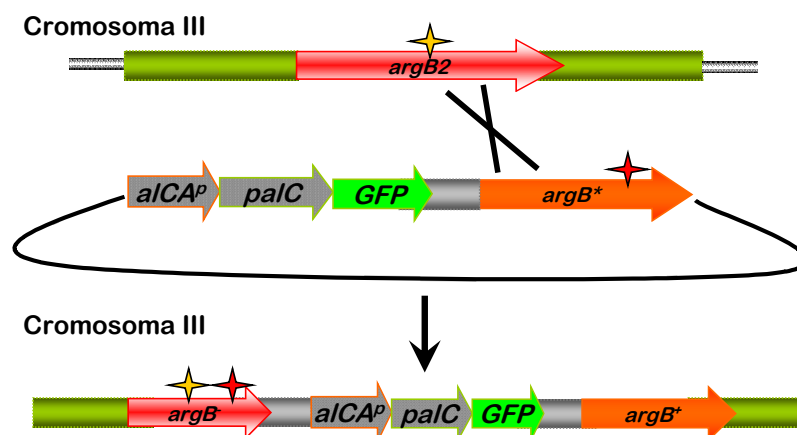


Figura CR.-17: Representación esquemática de la integración en copia única de la construcción *alcA(p)::palC::GFP* en el locus *argB*. Los alelos *argB2* (estrella amarilla) y *argB** (estrella roja) son alelos mutantes de pérdida de función de *argB*.

En germínulas o hifas cultivadas a pH ácido en condiciones de inducción, PalC::GFP se localiza en el citosol y en estructuras punteadas que se distribuyen a largo de toda su longitud (Figura CR-18 A). Este patrón punteado no aparece en una estirpe que expresa la proteína GFP, en la que se observó una distribución nucleocitosólica uniforme de dicha proteína (Figura CR-18 B).

Para determinar si la localización de PalC cambia dependiendo del pH ambiental, se cultivaron en condiciones de inducción germínulas con el transgén *alcA^p::palC::GFP*, a pH ácido (pH 5,2) durante 16-18 horas. Posteriormente, se transfirieron a medios con glucosa al 1% w/v como única fuente de carbono, para reprimir la expresión del transgén, ajustados a un pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) o alcalino (pH 8,3), y se incubaron en dichos medios durante 30 minutos antes de su estudio por microscopía de epifluorescencia. En este estudio se observó que, el cambio de los cultivos de un pH ácido a uno neutro o alcalino da lugar a un incremento muy notable del número de puntos en los que se localiza PalC::GFP, incremento que no se observó con el cambio a pH ácido. Estas estructuras punteadas parecían localizarse preferentemente en la región cortical de las células. Se demostró que, el cambio de la fuente de carbono del medio (de condiciones de inducción, 1% etanol, a condiciones de represión, 1% w/v de glucosa) no afecta por sí sólo a la localización de PalC::GFP (Figura CR.-18 C) y que, por tanto, el efecto observado es atribuible al cambio de pH ambiental.

En la estirpe control, que expresa GFP bajo el control de *alcA*, no se observaron estas estructuras ni a pH ácido ni a pH alcalino (Figura CR.-18 B.). No obstante, para descartar la posibilidad de que la aparición de esos puntos se debiese a auto-fluorescencia producida por el estrés generado por el cambio a pH alcalino, se llevaron a cabo experimentos de cambio de pH en la cepa que expresa, bajo el control del promotor *alcA*, PalC sin marcar. Tampoco en este caso se observaron las estructuras corticales fluorescentes

Aunque la localización de PalC::GFP responde a pH, el patrón punteado pudiera ser un artefacto debido a la sobreexpresión de la proteína de fusión bajo el control del promotor *alcA*, que en condiciones de inducción es un promotor muy fuerte. Por esto, se decidió generar, mediante reemplazamiento génico, una cepa que expresase PalC::GFP bajo el promotor de *palC*. De esta forma, se observaría el comportamiento de PalC::GFP expresada a

niveles fisiológicos (Figura CR.-19 A.). Además, el procedimiento empleado para etiquetar PalC²²⁹ introducía, como nexo de unión entre las dos proteínas, una región con cinco repeticiones del péptido Gly-Ala, que no se había empleado en la construcción *alcA^o::PalC::GFP*. Esta región puente entre las dos proteínas reduce la posibilidad de que la GFP afecte al plegamiento correcto de PalC y, por lo tanto, que la proteína de fusión forme agregados en el interior de la célula.

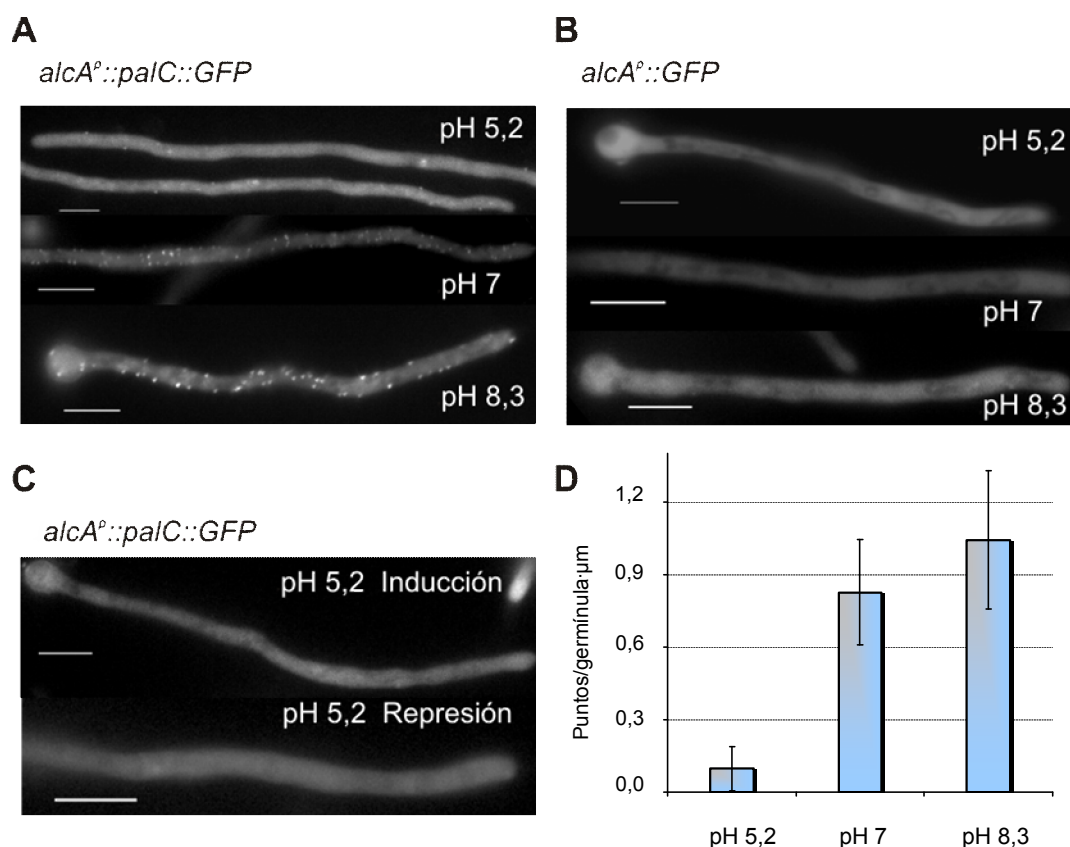


Figura CR.-18: Localización de la proteína PalC::GFP expresada bajo el promotor de *alcA*. A) Esporas de una estirpe con el transgén *alcA^o::palC::GFP* se germinaron en condiciones de inducción a pH ácido y se transfirieron a condiciones de represión a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) o alcalino (pH 8,3) 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. B) Esporas de una estirpe con el transgén *alcA^o::GFP* sometidas a los mismos regímenes. C) Células de una estirpe con el transgén *alc::palC::GFP* germinadas en condiciones de inducción a pH ácido (inducción), se transfirieron a condiciones de represión a pH ácido (represión) (pH 5,2). El cambio de las condiciones de inducción a las de represión no cambia la localización subcelular de la GFP. La barra representa en todos los casos 5 μm. D) Cuantificación de las estructuras corticales a las que PalC::GFP se asocia a pH ácido, neutro y alcalino. En el gráfico se observa un aumento del número de puntos, en función de la longitud de las células, de casi 10 veces cuando se transfieren a pH neutro o alcalino con respecto al pH ácido (pH 5,2: 0,1 puntos/μm, n≥25; pH 7 0,89 puntos/μm, n≥25; pH 8,3: 1,04 puntos/μm, n≥25), sin que exista una diferencia significativa en el número de puntos entre el pH neutro y el pH alcalino. Las barras indican el error estándar.

Los clones con el reemplazamiento génico de PalC por PalC::GFP tienen un fenotipo indistinguible del de una estirpe silvestre en los tests de crecimiento diagnósticos para la ruta de pH, y la proteína de fusión presente en extractos celulares tiene el tamaño esperado, tal como se determinó por western-blot (*vide infra*). En estos clones se observó un patrón punteado similar al de las estirpes que expresan PalC::GFP bajo el promotor del gen *alcA*, aunque la intensidad de fluorescencia de los puntos y del citosol es menor, lo que pone de manifiesto

un menor nivel de expresión de la proteína de fusión con respecto a la expresión bajo el promotor *alcA^P*. Pero, lo más importante es que, los reemplazantes génicos se comportaron igual que las cepas que llevan el transgén basado el promotor *alcA^P*, ya que en ambos casos existe un notable aumento de las estructuras corticales a las que PalC::GFP se localiza al cambiar el pH del medio de ácido a alcalino (Figura CR-18 B y 19 B), lo que indica que, efectivamente, PalC se relocaliza desde el citosol a estas estructuras cuando el pH ambiental se alcaliniza. Esta relocalización de PalC se observó tanto a pH neutro (pH 7) como a pH alcalino (pH 8,3), y no existe una diferencia significativa en el número de las estructuras corticales en relación a la longitud de la célula (germinulas o hifas) entre estos dos valores de pH. Por tanto, la respuesta de PalC frente a la alcalinización del pH del medio parece ser una respuesta de tipo todo o nada: superado un cierto umbral de pH, PalC::GFP se relocaliza en estructuras corticales a lo largo de la hifa, y no responde de manera evidente al incremento del pH por encima de ese umbral (Figura CR-18 C y 19 C).

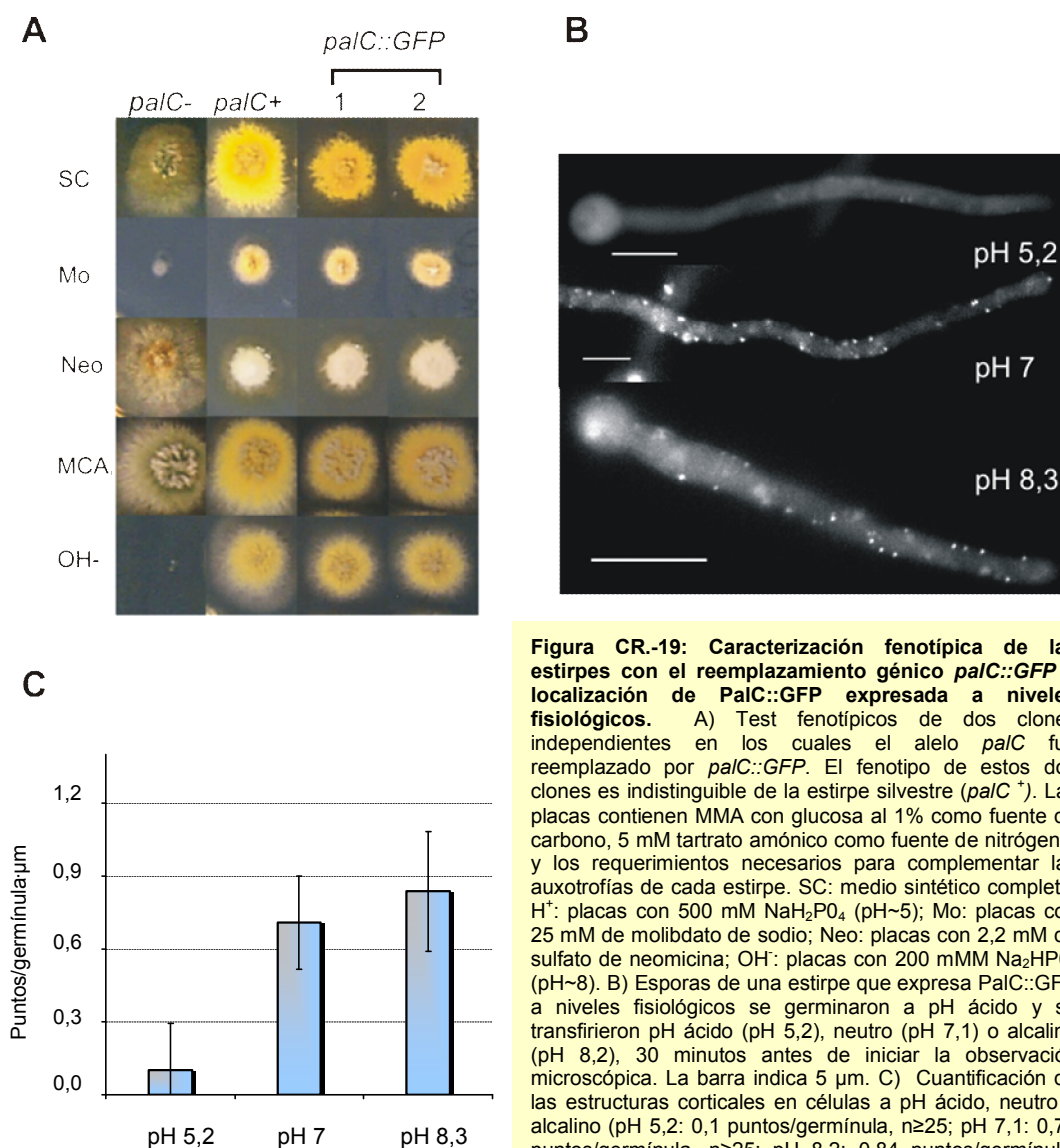


Figura CR-19: Caracterización fenotípica de las estirpes con el reemplazamiento génico *palC::GFP* y localización de PalC::GFP expresada a niveles fisiológicos. A) Test fenotípicos de dos clones independientes en los cuales el alelo *palC* fue reemplazado por *palC::GFP*. El fenotipo de estos dos clones es indistinguible de la estirpe silvestre (*palC*⁺). Las placas contienen MMA con glucosa al 1% como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno, y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada estirpe. SC: medio sintético completo; H⁺: placas con 500 mM NaH₂PO₄ (pH~5); Mo: placas con 25 mM de molibdato de sodio; Neo: placas con 2,2 mM de sulfato de neomicina; OH⁻: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8). B) Esporas de una estirpe que expresa PalC::GFP a niveles fisiológicos se germinaron a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7,1) o alcalino (pH 8,2), 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. La barra indica 5 µm. C) Cuantificación de las estructuras corticales en células a pH ácido, neutro y alcalino (pH 5,2: 0,1 puntos/germinula, n≥25; pH 7,1: 0,71 puntos/germinula, n≥25; pH 8,2: 0,84 puntos/germinula, n≥25). Las barras indican el error estándar.

Para demostrar que la localización de PalC a las estructuras corticales es transitoria y depende exclusivamente del pH, se estudió el efecto que tenía el cambio de pH neutro a ácido, tanto en las cepas que expresan PalC::GFP a niveles fisiológicos como en las que la expresan bajo el control de *alcA^P*. Como se ha descrito anteriormente, las germinulas precultivadas a pH ácido se transfirieron a pH ácido (pH 5,2) y a pH neutro (pH 7). A los 30 minutos de incubación, se cuantificó la diferencia en el número de puntos entre las germinulas crecidas a pH ácido y a pH neutro (Figura CR.-20). Las células que habían sido incubadas durante 30 minutos a pH neutro se transfirieron nuevamente a pH ácido (pH 5,2) o a pH neutro (pH 7), y se incubaron durante 15 minutos antes de su observación microscópica. Como control, células incubadas 30 minutos a pH ácido se transfirieron de nuevo a pH ácido.

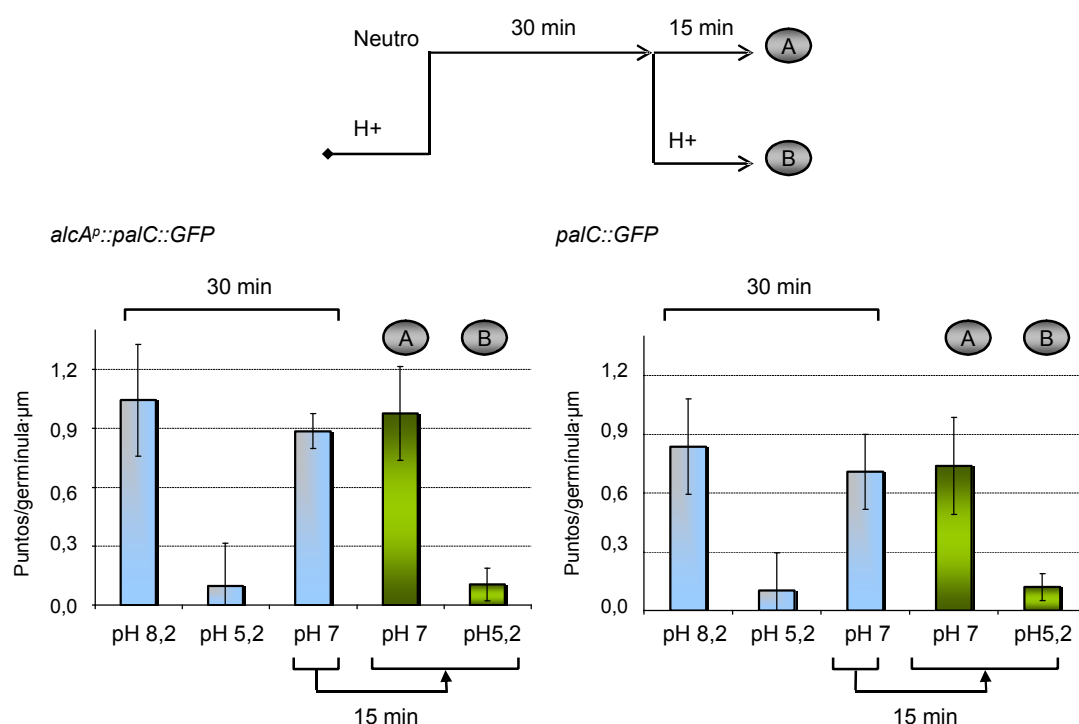


Figura CR.-20: El cambio de un medio con pH neutro a uno con pH ácido deslocaliza a PalC::GFP de las estructuras corticales. Los gráficos representan los resultados obtenidos en los dos tipos de estirpes que expresan PalC::GFP, [una desde el transgén basado en el promotor *alcA^P* (*alcA::PalC::GFP*) y otra bajo el control del promotor de *palC* (*palC::GFP*)]. Esporas de las dos estirpes se germinaron a pH ácido, y se transfirieron a pH alcalino, ácido y neutro, 30 minutos antes de la cuantificación de los puntos corticales (pH 8,2: 0,84 puntos/germinula, n>25; pH 5,2: 0,1 puntos/germinula, n>25; pH 7,1: 0,71 puntos/germinula, n>25). Las células transferidas a pH neutro se volvieron a transferir a medios ajustado a pH ácido y a pH neutro durante 15 minutos, antes de la cuantificación de las estructuras corticales (pH 5,2: 0,12 puntos/germinula, n>25; pH 7,1: 0,74 puntos/germinula, n>25). Las barras indican el error estándar.

En ambos casos, se determinó el número de estructuras punteadas tras los 15 minutos adicionales de incubación. Las células transferidas de pH neutro a pH ácido tenían el mismo número, relativamente bajo, de puntos por μm que las que habían permanecido siempre a pH ácido, mientras que en las células mantenidas a pH neutro, el número de puntos por μm fue nueve veces mayor que en las transferidas desde pH alcalino a pH ácido. Concluimos que, el cambio de pH neutro a pH ácido deslocaliza PalC::GFP de las estructuras corticales en la que

se encuentra cuando el pH del medio es alcalino o neutro, y que, por tanto, la localización es reversible. Teniendo en cuenta estos resultados, inferimos que las estructuras corticales en las que se localiza PalC::GFP, y que dan lugar a un patrón punteado, representan, seguramente, una localización fisiológica de PalC

4.4.2 LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalC EN ESTRUCTURAS CORTICALES DEPENDE DEL RECEPTOR DE 7-TMD PalH, PERO NO DE PalA

Una condición *sine qua non* para que el cambio de la localización de PalC::GFP estuviese implicado en el funcionamiento de la ruta de transducción de señal es que dicho cambio debería ser consecuencia de la activación de la ruta *pal* debida al incremento de pH. Por esto, se comprobó si el cambio en la localización de PalC necesita del receptor de 7-TMD y, casi con certeza, sensor de pH, PalH. Si el cambio de localización dependiese no sólo de pH, sino también de los componentes de la ruta *pal* que están situados aguas arribas de PalC en la ruta, se reforzaría la conclusión de que la presencia de PalC en las estructuras corticales refleja de alguna manera su función fisiológica.

palH72 es un alelo nulo que trunca la proteína PalH (760 residuos) tras el aminoácido 12. Obtuvimos mediante recombinación meiótica estirpes con el alelo *palH72* que expresaban PalC::GFP bajo su propio promotor o bajo el control del promotor *alcA*. En el caso de las estirpes *alcA::palC::GFP*, se seleccionaron aquellas que, además, portaban el alelo *palC4*, de manera que nos aseguramos que su única fuente de PalC fuese PalC::GFP. El genotipo de las diferentes cepas se confirmó por secuenciación directa de los alelos *pal*. Mediante western-blot, se demostró que PalC::GFP se expresa al mismo nivel en un fondo genético *palH72* o en un fondo *palH⁺* (Figura CR.-21 A, carriles 1, 4 y 5). Se analizó, por microscopía de epifluorescencia, la localización de PalC::GFP en cepas *palH⁺* y *palH72*, descendientes del mismo cruce. Tanto las cepas *palH⁺* como *palH72* la fluorescencia a pH ácido aparecía, casi exclusivamente, en el citosol. Cuando el pH del medio se alcalinizó se observó que *palH72* previene la localización característica en estructuras corticales de PalC::GFP que sí se observó en las cepas *palH⁺* (Figura CR- 21 B y C).

De la misma manera se analizó, si la localización de PalC::GFP se veía afectada en un fondo genético *palA34* (este alelo mutante trunca la proteína PalA de 897 residuos en el residuo 32, por lo que se puede considerar como un alelo nulo). Al contrario de lo que sucede con *palH72*, *palA34* no afecta a la localización de PalC::GFP. El número de estructuras corticales que se observaron en una estirpe *palA⁺* es similar al de las estirpes *palA34*, tanto a pH ácido como alcalino (Figura CR.-21). PalA es el componente prototípico del complejo localizado en la membrana del endosoma, ya que interacciona con Vps32 y con PacC⁷². El hecho de que PalC se relocalice en puntos corticales de manera dependiente de pH y del receptor 7-TMD PalH, pero independiente de PalA, demuestra que el papel de PalC en la ruta de transducción de señal está por debajo del complejo localizado en la membrana plasmática, y por encima, o al mismo nivel, que el complejo asociado al endosoma, en el cual se encuentra PalA.

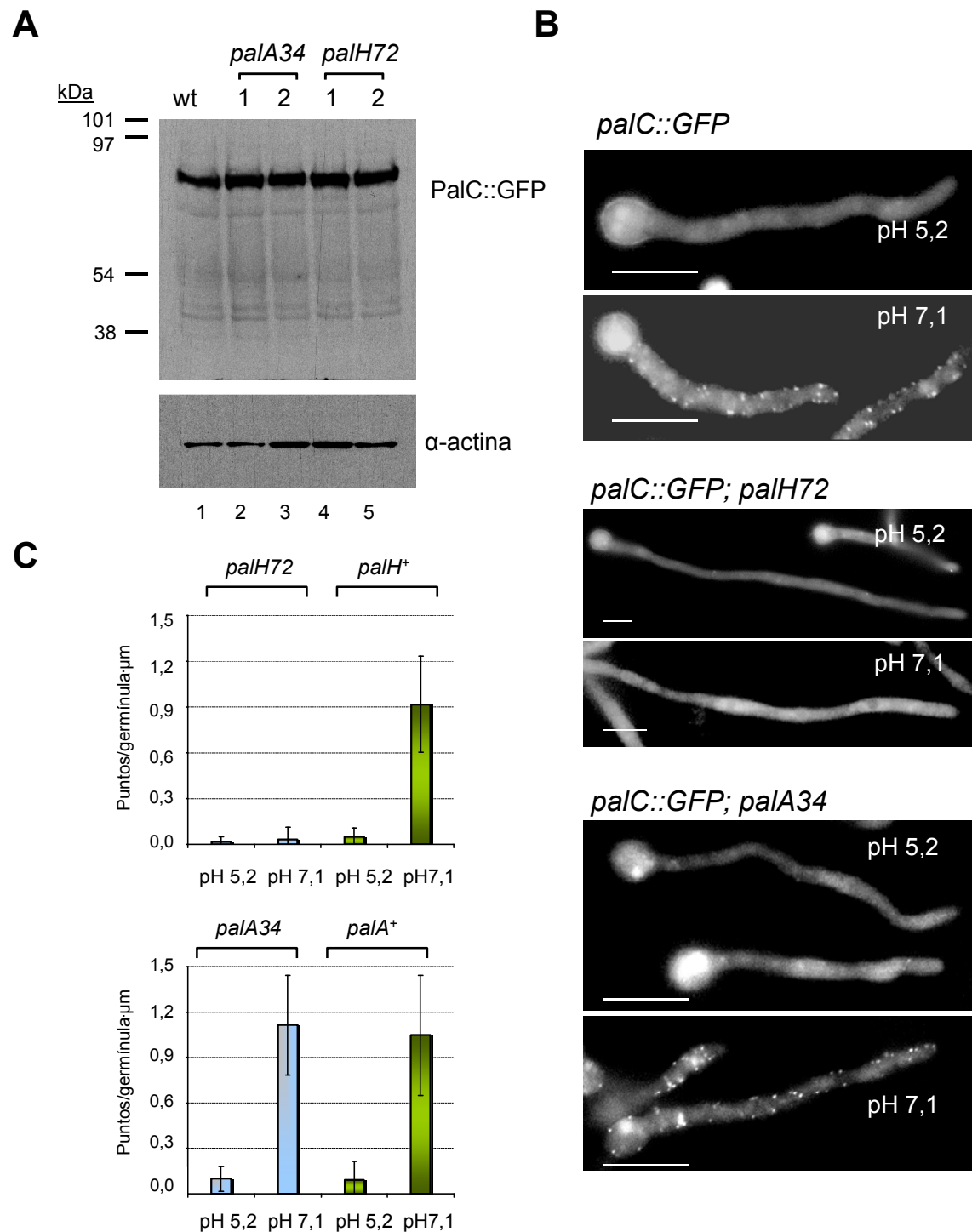


Figura CR.-21: La localización de PalC::GFP es dependiente de PalH pero no de PalA. Se observó la localización de PalC::GFP expresada a niveles fisiológicos en un fondo *palH⁻* (*palH72*) y en un fondo *palA⁻* (*palA34*). A) Análisis por western-blot de las estirpes dobles mutantes *palC::GFP palA34* y *palC::GFP palH72* usando un anticuerpo α-GFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo α-actina. Se analizaron dos clones independientes (1 y 2) de cada uno de los genotipos. B) Imágenes de la localización de PalC::GFP en una estirpe silvestre y en las mutantes, a pH ácido y a pH neutro. Las barras indican 5 μm. C) Cuantificación de los puntos corticales, a pH ácido y a pH neutro, en las estirpes mutantes (azul) y silvestres (verde) (*palH72*: pH 5,2: 0,03 puntos/germinula, n≥25; pH 7,1: 0,02 puntos/germinula, n≥25; *palH⁺*: pH 5,2: 0,05 puntos/germinula, n≥25; pH 7,1: 0,92 puntos/germinula, n≥25; *palA34*: pH 5,2: 0,1 puntos/germinula, n≥25; pH 7,1: 1,11 puntos/germinula, n≥25; *palA⁺*: pH 5,2: 0,09 puntos/germinula, n≥25; pH 7,1: 1,05 puntos/germinula, n≥25;).

4.4.3 EFECTO DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN A LA UNIÓN DE PalC CON Vps32 EN LA LOCALIZACIÓN DE PalC::GFP.

Con el objetivo de estudiar si la localización de PalC depende de su capacidad para interactuar con Vps32, se introdujeron en el transgén *alcA^p::palC::GFP* mutaciones que dieran lugar a las sustituciones Arg442Ala, Pro439Phe o Tyr451Ala y a la delección del residuo Arg442. Se comprobó que, ninguno de los transgenes mutantes resultantes complementa el alelo *palC4*. Por ejemplo, en las pruebas diagnósticas de regulación por pH, las distintas estirpes *palC4*, que llevan los transgenes mutantes, fueron sensibles a molibdato, tanto en condiciones de inducción como de represión de *alcA^p*, e incapaces de crecer en medio alcalino, un fenotipo idéntico al que presentan las estirpes *pal⁻* (Figura CR.-22 A) (Nótese que, esto demuestra que las sustituciones Arg442Ala y Tyr451Ala, de las cuales no se conocía su fenotipo en *A. nidulans*, provocan la pérdida de función de PalC).

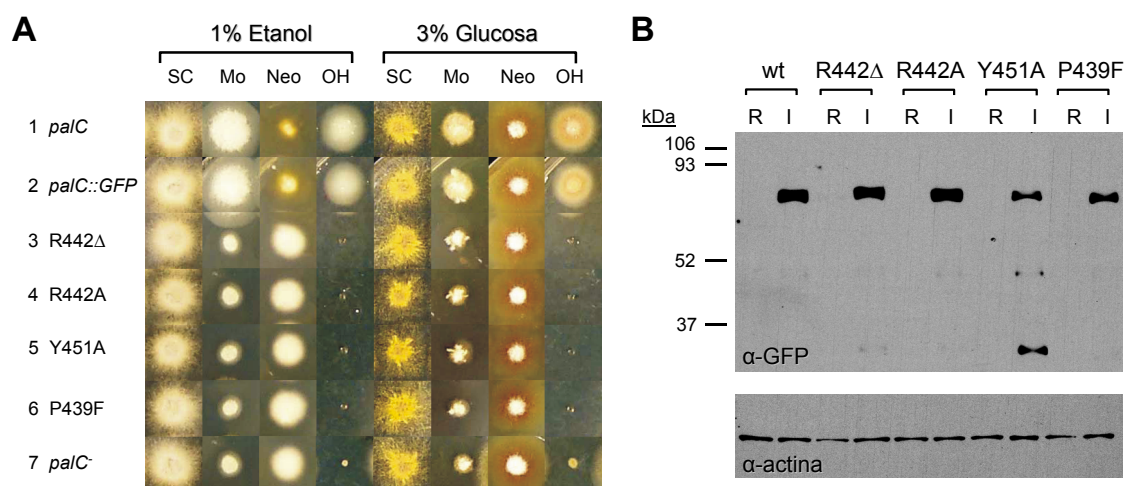


Figura CR.-21: Caracterización fenotípica de las estirpes con transgenes mutantes *alcA^p::palC::GFP* en condiciones de inducción (1% v/v etanol, 0,05% w/v glucosa) y en condiciones de represión (3% w/v glucosa). A) La mutación de pérdida total de función, *palC4*, provoca que las estirpes mutantes sean hipersensibles a molibdato, hiperresistentes a neomicina y que no crezcan a pH alcalino. La complementación de esta mutación se detecta por los aumentos en la tolerancia a molibdato y la sensibilidad a neomicina y por el crecimiento a pH alcalino en condiciones de inducción, pero no de represión. Ninguno de los transgenes que codifican para las proteínas PalC::GFP mutantes (R442Δ: *alcA^p::palC^{R442Δ}::GFP*; R442A: *alcA^p::palC^{R442A}::GFP*; Y451A: *alcA^p::palC^{Y451A}::GFP*; P439F: *alcA^p::palC^{P439F}::GFP*) (filas 3 a 6) complementa la mutación *palC4*. La expresión basal del promotor *alcA* del transgén silvestre en condiciones de represión permite el crecimiento a pH alcalino y aumenta la resistencia a molibdato. *palC*: *alcA^p::palC*; *palC::GFP*: *alcA^p::palC::GFP*; *palC⁻*: transformante isogénico *argB⁺* carente del transgén, obtenido por conversión génica. Las placas contienen MMA con glucosa al 3% o etanol 1% (más 0,05% glucosa) como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada estirpe. SC: medio sintético completo; Mo: 25 mM Na₂MoO₄; Neo: 2,2 mM sulfato de neomicina; OH: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8). B) Análisis por western-blot de las proteínas PalC::GFP mutantes. El micelio de las estirpes con los transgenes *alcA^p::palC::GFP* (silvestre y mutantes) se cultivó en condiciones de represión (R) y de inducción (I). Las muestras se analizaron con el anticuerpo α-GFP para la detección de PalC::GFP y el anticuerpo α-actina como control de carga.

El análisis por western-blot demostró que, en condiciones de inducción, el nivel de expresión y la estabilidad de las proteínas mutantes con las sustituciones Arg442Ala y Arg442Δ son similares a la proteína PalC::GFP silvestre (Figura CR.-22 B, carriles 2, 4 y 6). En cambio, los niveles de las proteínas de fusión con las

sustituciones Tyr451Ala y Pro439Phe son claramente menores (Figura CR.-22 B, carriles 8 y 10). En el caso de PalC^{Y451A}::GFP se detectaron bandas de degradación muy patentes, lo que indica que esta sustitución disminuye la estabilidad de la proteína. En la Figura CR.-23 A se observa cómo en los mutantes que expresan PalC^{R442A}::GFP, PalC^{P439F}::GFP y PalC^{Y451A}::GFP la fluorescencia se localiza en el citosol y, de manera dependiente de pH, en estructuras corticales, aunque la fluorescencia del citosol es más intensa en la proteína PalC^{Y451A}::GFP [esto se explica si se tiene en cuenta que, entre las bandas de degradación que se detectan, la banda más intensa probablemente se corresponde con la GFP (Figura CR.-22 B, western-blot anti-GFP, carril 8)]. Por el contrario, en el mutante con la sustitución Arg442Ala no se observaron las estructuras corticales en las que se localiza PalC::GFP a ninguno de los dos valores de pH (Figura CR.-23 A).

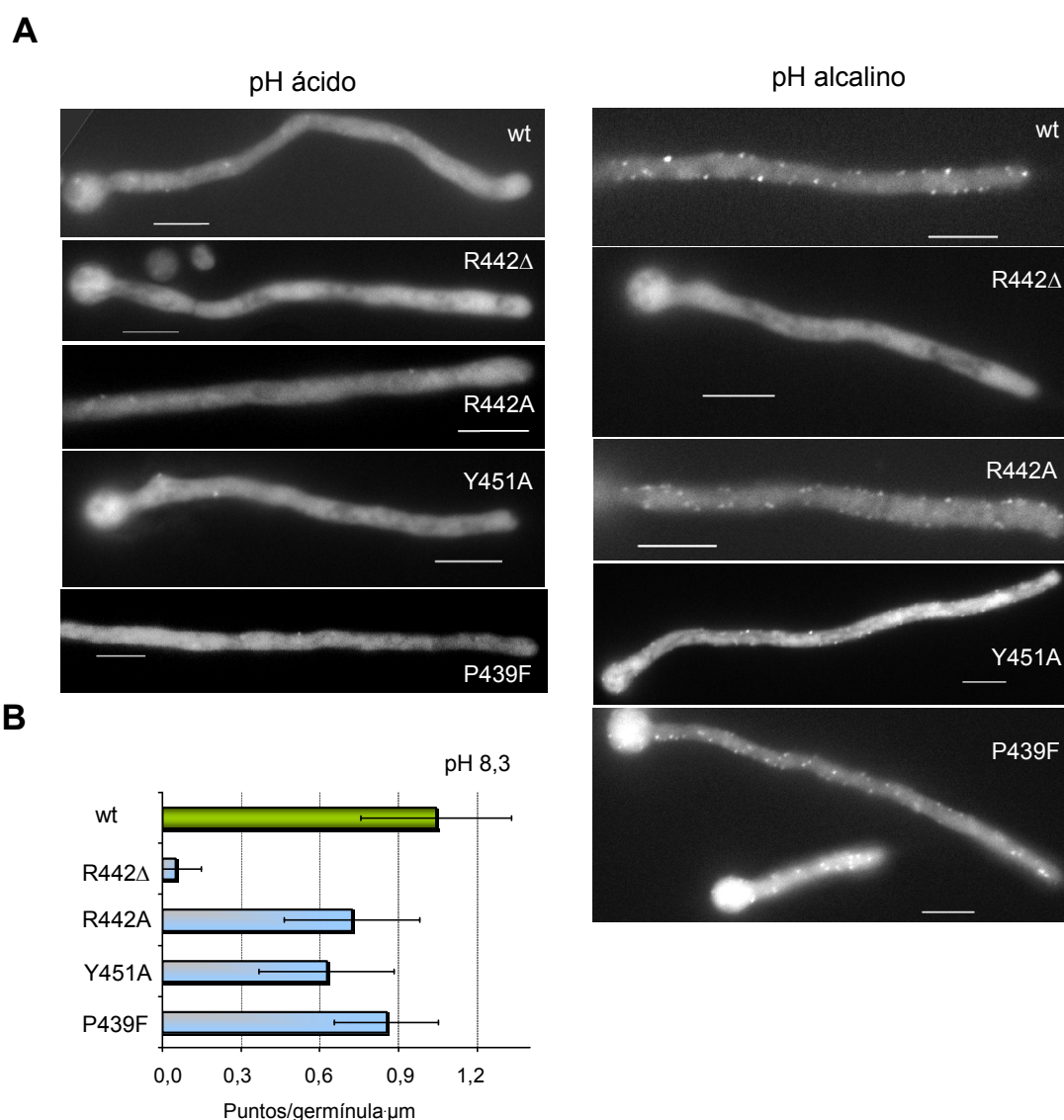


Figura CR.-23: Efecto de las mutaciones que previenen la unión de PalC a Vps32 en la localización de PalC::GFP. A) Imágenes de la localización de PalC::GFP a pH ácido (pH 5,2) y pH alcalino (pH 8,3) en las estirpes silvestres y en las mutantes. B) Cuantificación de la estructuras corticales de una estirpe silvestre (wt; verde) y de las mutantes (azul) en medio alcalino (wt: 1,04; R442Δ: 0,05; R442A: 0,72; Y451A: 0,63; P439F: 0,85 puntos/germinula, n≥25).

Aunque, a pH alcalino, el número de estructuras corticales en las germinulas de las estirpes *palC^{R442A}::GFP* y *palC^{P439F}::GFP* tiende a ser menor que en la estirpe *palC::GFP*, estas diferencias no llegan a ser significativas. En el caso concreto de la estirpe *palC^{Y451A}::GFP*, se observó una diferencia más acusada en el número de puntos con respecto a *palC::GFP*, debida seguramente a que la proteína *PalC^{Y451A}::GFP* es menos estable que *PalC::GFP*. En definitiva, las tres sustituciones no tienen ningún efecto drástico en la localización de *PalC* en estructuras corticales. Teniendo en cuenta que las sustituciones Pro439Phe, Tyr451Ala, y Arg442Ala en *PalC* impiden o dificultan su interacción con Vps32 (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.2.5), estos resultados indican que la relocalización de *PalC* en respuesta al pH alcalino no depende de Vps32.

Sin embargo, la delección de la Arg442 que, como se ha demostrado, también elimina la interacción con Vps32, suprime la relocalización característica de *PalC::GFP* en estructuras corticales. La delección de este residuo debe de afectar a algún aspecto, independiente de Vps32, necesario para dicha relocalización. La eliminación del residuo 442 introduce en esa posición el Asp443 y provoca el cambio de posición del resto de residuos que se encuentran aguas abajo. Podemos suponer que la delección de la Arg442 impide la unión a Vps32 pero, a la vez, afecta a la estructura u orientación de un dominio implicado en la localización de *PalC* en las estructuras corticales. Si esto fuera cierto, *PalC* tendría al menos dos regiones funcionales diferenciadas: una de ellas en el dominio Bro1, involucrada en la unión a Vps32, y otra en la que estaría de alguna manera implicada la región C-terminal, que mediaría la asociación de *PalC* a puntos corticales dependiendo del pH ambiental.

Para contrastar esta interpretación, obtuvimos cepas que expresan las proteínas de fusión *PalC(1-454)::GFP* y *GFP::PalC(446-507)* bajo el control del promotor *alcA^P*, mediante integración de los transgenes en el locus *argB*. *PalC(1-454)* es una versión truncada de *PalC*, que incluye la región completa que se corresponde con el dominio Bro1 además de ocho residuos adyacentes que forman el motivo rico en prolina, donde se localiza la Tyr451. En cambio, *PalC(446-507)* es un fragmento C-terminal que va desde el inicio del motivo rico en prolina hasta el final de la proteína (En este caso, se consideró que la mejor opción era fusionar la GFP al extremo N-terminal del fragmento de *PalC*, para colocar una estructura proteica estable en el extremo N-terminal).

Con ninguna de estas quimeras con GFP se observó el patrón punteado característico de *PalC::GFP* completo (datos no mostrados). En el caso de la proteína *PalC(1-454)::GFP*, no se puede inferir que el dominio Bro1 no esté implicado en la asociación de *PalC* a los puntos corticales, ya que el truncamiento tras el residuo 454 afecta drásticamente a la estabilidad y/o solubilidad de la proteína de fusión. La cantidad de proteína *PalC(1-454)::GFP* soluble en un extracto acelular de *A.nidulans* es mucho menor que la de *PalC::GFP*, como se comprobó mediante western-blot. Además, en el material insoluble se detectó la proteína completa *PalC(1-454)::GFP* junto con un patrón de bandas de degradación muy acusado. En cambio, *GFP::PalC(446-507)* se detectó en los western-blot en mayor cantidad, aunque también con numerosas bandas de degradación (Figura CR.-24).

En los análisis mediante western-blot de las presas para los experimentos de doble híbrido también se detectó mucha menos cantidad de proteína en las presas con truncamientos en la región C-terminal de *PalC* (véase Figura CR.-10). Todo esto podría indicar que la región C-terminal de *PalC* es crítica para el correcto plegamiento de *PalC*, y, por ende, para la estabilidad de la proteína.

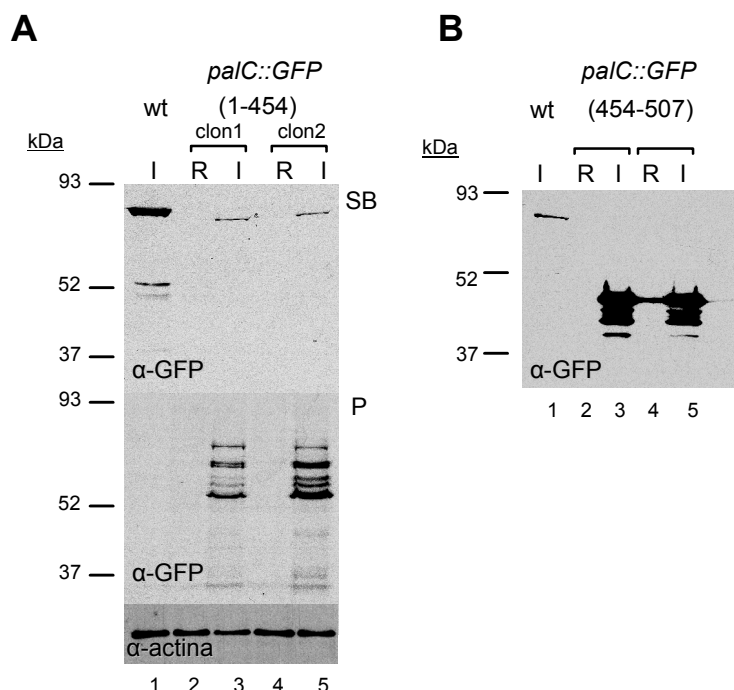


Figura CR.-24: Análisis por Western blot de la expresión de las proteínas PalC(1-454)::GFP y GFP::PalC(454-507). A) El micelio de dos clones independientes con el transgén *alcA^p::palC(1-454)::GFP* se cultivó en condiciones de represión (R) o de inducción (I) y se procesó para su análisis por western-blot. Tras separar el sobrenadante (panel superior, SB) de los restos no solubles del micelio por centrifugación, éstos se resuspendieron en un volumen igual al sobrenadante obtenido, y se analizaron por western-blot (panel inferior, P). Se utilizó un anticuerpo α -GFP para detectar PalC::GFP y un anticuerpo α -actina como control de carga. wt: estirpe *alcA^p::palC::GFP*; *palC::GFP* (1-454): estirpe *alcA^p::palC(1-454)::GFP*. B) Análisis por western-blot de la estirpe con el transgén *alcA^p::GFP::PalC(454-507)*. El micelio de dos clones independientes se cultivó en condiciones de represión (R) y de inducción (I) y las muestras se analizaron con el anticuerpo α -GFP. wt: estirpe *alcA^p::palC::GFP*, *palC::GFP* (454-507): estirpe *alcA^p::GFP::PalC(454-507)*.

4.4.4 LAS MUTACIONES *palF15* Y *palI32* TIENEN EFECTOS DISTINTOS EN LA LOCALIZACIÓN DE PalC::GFP

La localización de PalC en estructuras corticales no requiere la unión a Vps32 y es independiente de PalA, dos componentes del hipotético complejo asociado a la membrana del endosoma. Ya se ha demostrado, anteriormente, la dependencia de PalH en la relocalización característica de PalC::GFP (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.4.2). De los otros dos componentes del complejo de membrana plasmática, PalF y PalI, la β -arrestina PalF interacciona con la cola citoplásmica de PalH¹⁸⁰, y puesto que las arrestinas sufren cambios conformacionales dependientes de la activación del receptor, es un candidato evidente a participar de un modo directo en la asociación, dependiente de pH, de PalC a las estructuras corticales.

Para comprobar el efecto de PalF en la localización de PalC se cruzó una estirpe con el alelo *palF15* con otra que expresa PalC::GFP a niveles fisiológicos. El alelo *palF15* es una mutación sin sentido (“frameshift”) que trunca la proteína PalF de 776 residuos en el aminoácido 188, y da lugar a un fenotipo de pérdida total de función. Los descendientes del cruce se seleccionaron por análisis de su fenotipo en medios de cultivo diagnósticos de la ruta de pH y se comprobó su genotipo mediante PCR y secuenciación directa del gen *palF*. Mediante análisis de western-blot se comprobó que la expresión y estabilidad de la proteína PalC::GFP es similar en las estirpes *palF15* y *palF⁺* (Figura CR.-25 A). El análisis de estas estirpes por el microscopio de fluorescencia demostró que *palF15*, al igual que *palH72*, previene la localización de PalC::GFP en los puntos corticales (Figura CR.-25 B y C). Esto indica que PalC juega un papel corriente abajo del que juega la proteína PalF en la transducción de señal.

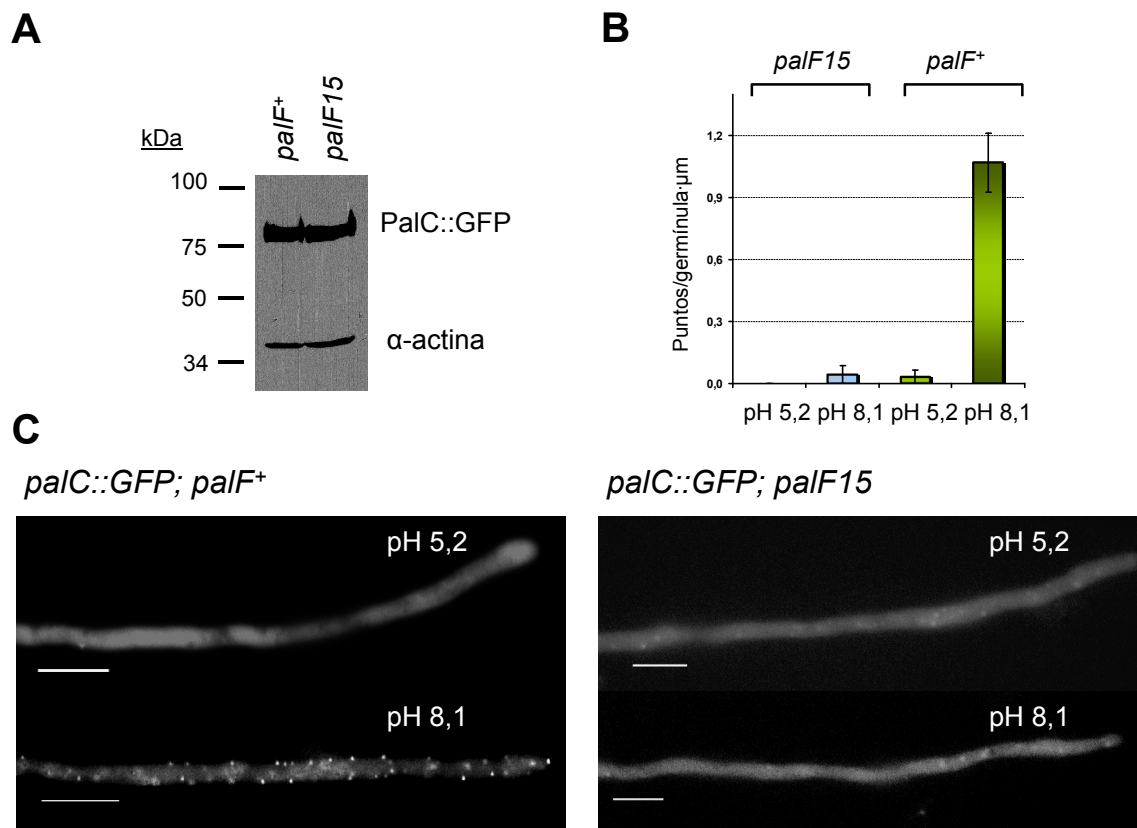


Figura CR.-25: La localización de PalC::GFP es dependiente de PalF. Se comparó la localización de PalC::GFP expresada a niveles fisiológicos en un fondo *palF*⁻ (*palF15*) con la de un fondo silvestre (*palF*⁺). A) Análisis por western-blot de la estirpe *palC::GFP palF15* con un anticuerpo α-GFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo α-actina. Se analizaron dos clones independientes (1 y 2). B) Cuantificación de los puntos corticales en condiciones ácidas y en condiciones alcalinas en una estirpe *palF15* (azul; pH 5,2: 0 puntos/germinula, n=23, pH 8,3: 0,04 puntos/germinula, n=23) y en una estirpe *palF*⁺ (verde; pH 5,2: 0,03 puntos/germinula, n=23; pH 8,3: 1,07 puntos/germinula, n=23). C) Imágenes de la localización de PalC::GFP en la estirpe *palF15* a pH ácido (pH 5,2) y alcalino (pH 8,1).

PalF se fosforila y ubiquitina de manera parcialmente dependiente de la proteína de 3-TMD¹⁸⁰. *palI32* es un alelo que se puede considerar “nulo”, ya que trunca la proteína de 536 residuos tras el residuo 83, y elimina los 3 TMD de la proteína. Resultaba interesante analizar la localización de PalC::GFP en un escenario carente de PalI. Así, se cruzó una estirpe *palI32* con otra *palC::GFP*. Al igual que en los casos anteriores, se comprobó el genotipo de los descendientes del cruce mediante PCR y secuenciación directa del gen *palI*, y, además, se confirmó que los niveles de PalC::GFP no se ven afectados por la mutación *palI32* (Figura CR.-26).

En ausencia de PalI, PalC::GFP se localiza en estructuras corticales de manera dependiente del pH del medio, aunque con algunas diferencias con respecto a la estirpe silvestre. La respuesta de PalC::GFP se produce muy rápidamente tras el cambio a pH alcalino, de manera que, en el silvestre, tras 15 minutos de incubación, ya se observa un marcado incremento en número de las estructuras corticales en los medios a un pH 7 (neutro) o pH 8 (alcalino) (Figura CR.-25 B) (aunque en estas estirpes el número de puntos por μm es algo menor a pH 7 que a pH 8, esta diferencia no fue significativa). Sin embargo, en un fondo *palI32*, a los 15 minutos del cambio de pH

sólo se observó un aumento de dichos puntos a pH 8 pero no a pH 7. Aún así, el número de puntos por μm a pH 8 en una estirpe *pall32* fue aproximadamente la mitad del conteo en una estirpe *pall*⁺ (Figura CR.-27 A y B).

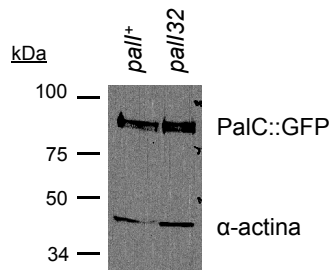


Figura CR.-26: Análisis por western-blot de la estirpe *palC::GFP pall32* con un anticuerpo α -GFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo α -actina. Se analizaron dos clones independientes (1 y 2).

Se había observado que si células de una estirpe silvestre se incuban de manera continuada a pH neutro o alcalino, el número de estructuras corticales con PalC::GFP disminuía. En el silvestre, el número de puntos de PalC::GFP se redujo tras 90 minutos de incubación a pH neutro en un 60%, y en un 30% a pH alcalino con respecto a las observaciones realizadas tras 15 minutos de incubación (Figura CR.-27 A y Figura CR.-28 A). En el caso de las estirpes *pall32*, tras 90 minutos de incubación las estructuras corticales prácticamente desaparecieron a pH neutro, y disminuyeron en un 90% a pH alcalino (Figura CR.-27 B y Figura CR.-28 B). Concluimos que la desaparición de PalC::GFP de las estructuras corticales en las que se encuentra, como consecuencia de una estimulación persistente de la ruta, es más acusada en ausencia de Pall

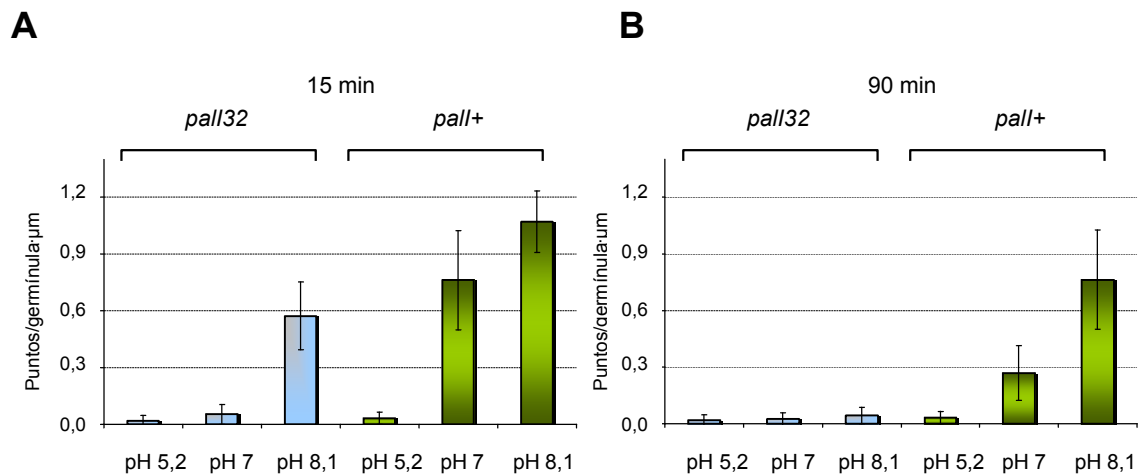


Figura CR.-27: La localización de PalC::GFP se ve afectada en un fondo *pall*. A) Cuantificación del número de estructuras corticales de PalC::GFP a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) y alcalino (pH 8,1) en una estirpe *pall32* (azul) y en una estirpe silvestre (verde) a los 15 minutos de la transferencia de células cultivadas a pH ácido a medios ajustados a pH ácido, neutro o alcalino. B) Cuantificación del número de estructuras corticales de PalC::GFP en una estirpe *pall32* (azul) y en una estirpe silvestre (verde) a los 90 minutos de la transferencia de las células cultivadas a pH ácido a medios ajustados a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) o alcalino (pH 8,1).

El fenotipo de pérdida parcial de función al que da lugar el alelo *pall32*, concuerda con una situación en la cual la ruta *pal*, aunque no quedaría completamente inactivada, sería mucho menos eficiente en la transducción de la señal. El reclutamiento de PalC::GFP a las estructuras corticales parece reflejar de alguna manera la activación del complejo situado en membrana plasmática. En un fondo *pall32*, el pH del medio tiene que ser más alto que en un fondo silvestre para que PalC se reclute a las estructuras corticales. Hipotetizamos que, esta ineficiencia relativa en la transducción de la señal subyace el menor número de puntos corticales, a los que la proteína PalC-GFP se localiza.

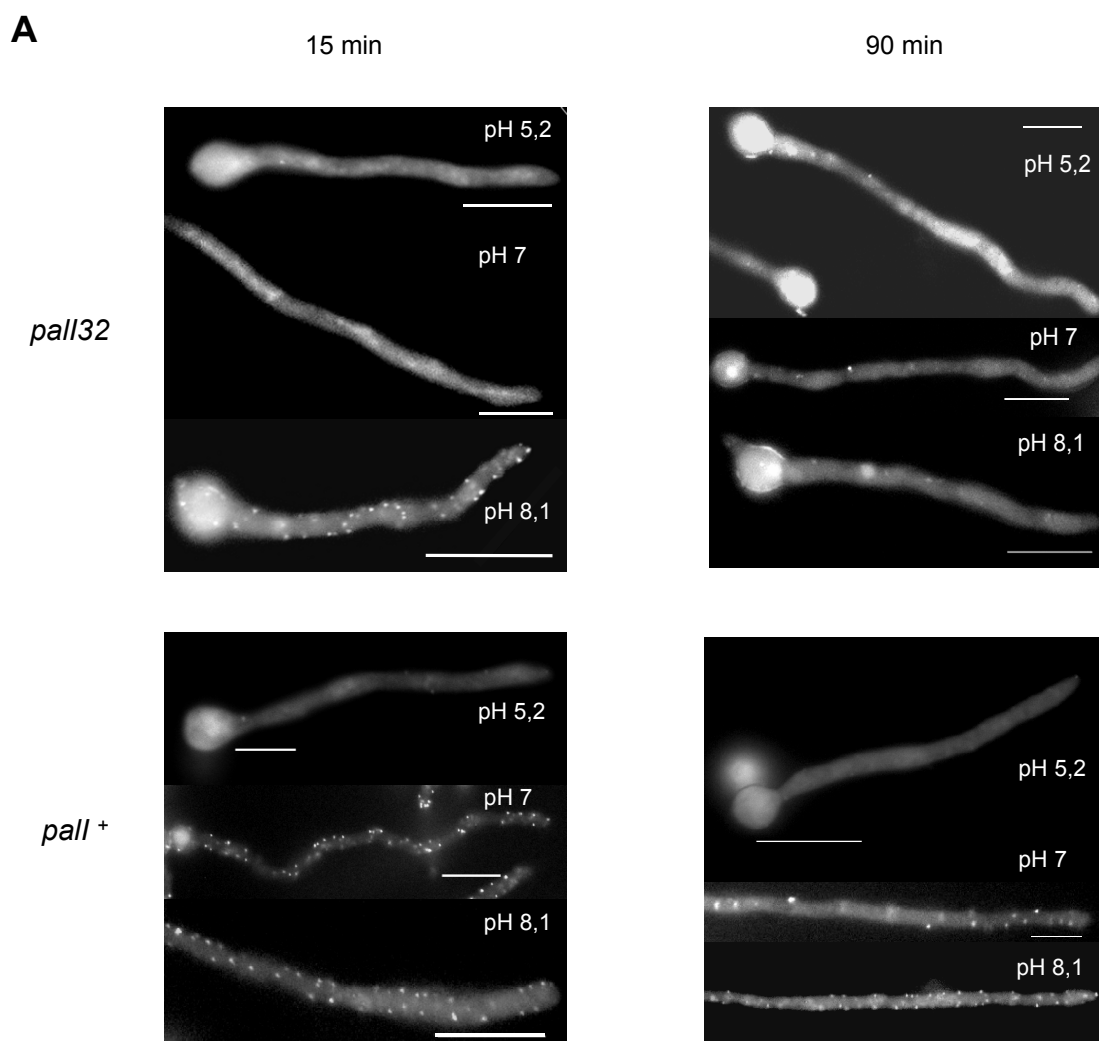


Figura CR.-28: La localización de PalC::GFP se ve afectada en un fondo *pall*. A) Cuantificación del número de estructuras corticales de PalC::GFP a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) y alcalino (pH 8,1) en una estirpe *pall32* (azul) y en una estirpe silvestre (verde) a los 15 minutos de la transferencia de células cultivadas a pH ácido a medios ajustados a pH ácido, neutro o alcalino. B) Cuantificación del número de estructuras corticales de PalC::GFP en una estirpe *pall32* (azul) y en una estirpe silvestre (verde) a los 90 minutos de la transferencia de las células cultivadas a pH ácido a medios ajustados a pH ácido (pH 5,2), neutro (pH 7) o alcalino (pH 8,1). C) Imágenes de las células *pall32* y *pall*⁺ a los 15 minutos de su transferencia al nuevo medio D) Imágenes de las células *pall32* y *pall*⁺ a los 15 minutos de su transferencia al nuevo medio. Las barras representan 5 μ m.

4.5 APROXIMACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE PalC

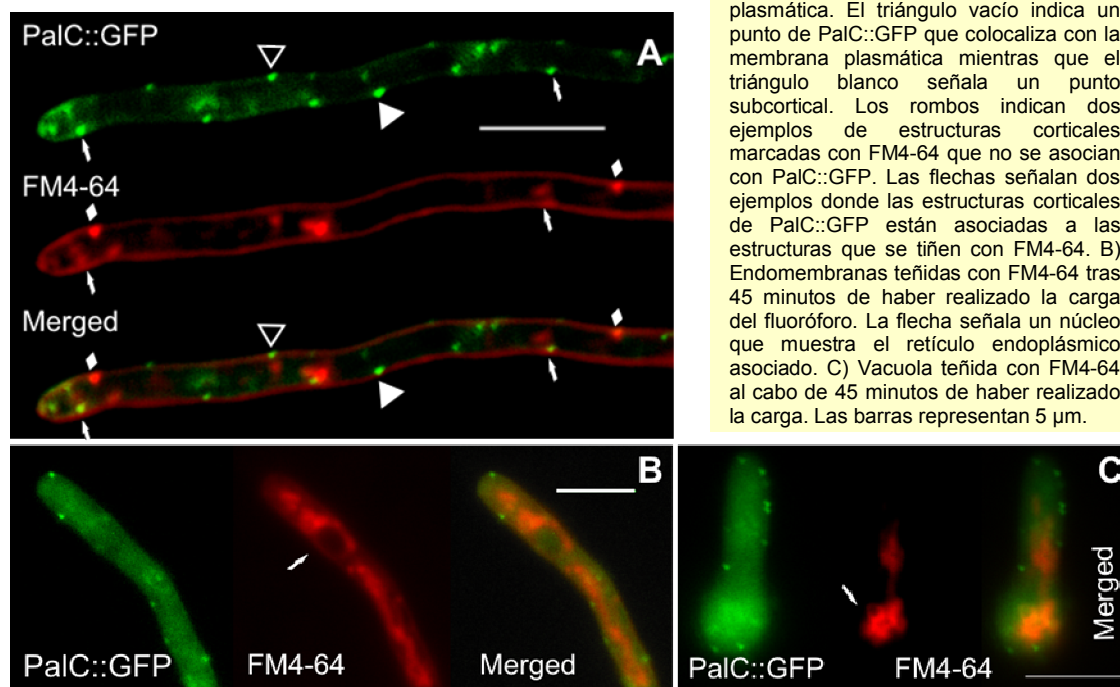
Como se ha descrito en la introducción, en el modelo de la ruta de pH, PalH, PalI y PalF forman el “complejo superior” situado en membrana plasmática, mientras que PalA, PalB y, transitoriamente, PacC forman el “complejo inferior”, situado en la membrana de los endosomas^{100,182}. Las β -arrestinas promueven la internalización endocítica de los receptores 7-TMD de membrana plasmática, de manera que median su desensibilización. No obstante, también pueden tener un papel positivo en la transducción de señal, nucleando el ensamblaje de complejos de señalización en la membrana de los endosomas tempranos²⁵². PalF es una β -arrestina¹⁸⁰, lo que indica que en la transducción de señal de pH está implicada la endocitosis, que podría facilitar la conexión de los dos complejos separados espacialmente. Esto sugirió que las estructuras a las que se recluta PalC::GFP podrían ser sitios de endocitosis de PalH.

4.5.1 PalC::GFP SE LOCALIZA EN ESTRUCTURAS CORTICALES ASOCIADAS A MEMBRANA PLASMÁTICA

Para caracterizar estas estructuras se usó el fluoróforo lipofílico FM4-64, que se inserta en la membrana plasmática y permite visualizar *in vivo* los distintos intermediarios de la ruta endocítica. Al cabo de 5 min tras la carga de las células con FM4-64, éste aparece, además de en la membrana plasmática, en puntos corticales que posiblemente representan sitios de internalización²³⁸. El marcaje con FM4-64 demostró que las estructuras que contienen PalC::GFP están estrechamente asociadas a la membrana plasmática (Figura CR.-29 A, triángulos), pero sólo ocasionalmente solapan con los puntos marcados con FM4-64 (Figura CR.-29 A, flechas). Después de 45 minutos, el fluoróforo marca las mitocondrias, el retículo endoplásmico (Figura CR.-29 B) y la membrana de las vacuolas (Figura CR.-29 C)²³⁸. Las estructuras corticales de PalC::GFP no se asocian con ninguno de estos compartimentos (Figura CR.-29 B, C).

Una posible explicación a la falta de colocación de PalC::GFP con los puntos corticales marcados con FM4-64 sería que éstos representasen sitios de internalización de bicapa lipídica, pero no de cargos proteicos. Otra sería que el FM4-64 marcara los sitios de internalización antes de que PalC se asociase o después de que se liberase de dichos sitios. En *S. cerevisiae*, dos componentes prototípicos de los sitios de endocitosis son Abp1p y Sla2p^{253,254}. Estas dos proteínas forman parte de los complejos multiproteicos que cambian de composición a lo largo del proceso de formación de la vesícula endocítica. Estos complejos median la polimerización de actina y la selección de los cargos proteicos en los sitios de endocitosis. Abp1p ejerce su función en una fase “tardía” en la formación de la vesícula endocítica, mientras que Sla2p la ejerce en una fase “temprana”²⁵³. Para estudiar si PalC se asocia a los complejos multiproteicos de internalización se analizó la localización de PalC::GFP en relación a estos marcadores. Para ello, se obtuvieron, mediante recombinación meiótica, cepas que coexpresan PalC::GFP y AbpA::mRFP o SlaB::mRFP (las proteínas AbpA y SlaB son los ortólogos en *A. nidulans* de Abp1p y Sla2p, respectivamente)²⁸.

Figura CR29: Las estructuras corticales de PalC están asociadas a la membrana plasmática. Marcaje de células de una estirpe que expresa PalA::GFP bajo el promotor *alcA* con FM4-64. A) Marcaje con FM4-64 de la membrana plasmática y puntos corticales. Las estructuras a las que se recluta PalC::GFP se localizan en una región cortical o subcortical asociadas a la membrana plasmática. El triángulo vacío indica un punto de PalC::GFP que colocaliza con la membrana plasmática mientras que el triángulo blanco señala un punto subcortical. Los rombos indican dos ejemplos de estructuras corticales marcadas con FM4-64 que no se asocian con PalC::GFP. Las flechas señalan dos ejemplos donde las estructuras corticales de PalC::GFP están asociadas a las estructuras que se tiñen con FM4-64. B) Endomembranas teñidas con FM4-64 tras 45 minutos de haber realizado la carga del fluoróforo. La flecha señala un núcleo que muestra el retículo endoplásmico asociado. C) Vacuola teñida con FM4-64 al cabo de 45 minutos de haber realizado la carga. Las barras representan 5 μ m.



AbpA::GFP o AbpA::mRFP se localizan en puntos móviles asociados a la membrana plasmática. A pH ácido, los puntos son más abundantes en las puntas de las hifas, en las que existe un collar subapical de internalización endocítica, que se cree juega un papel esencial en el crecimiento polarizado^{28,29,255}. Tras el cambio a pH alcalino, el collar subapical de AbpA desaparece (Figura CR.-30 A). El análisis de las cepas que coexpresan PalC::GFP y AbpA::mRFP mediante microscopía de fluorescencia, tanto *in vivo* como en muestras fijadas con paraformaldehído (para detener el movimiento de los puntos en los que se localiza AbpA::mRFP), reveló que estas dos proteínas no colocalizan (Figura CR.-30 B). De hecho, los puntos en los que se localiza AbpA::mRFP son subcorticales, y la mayoría de ellos se ven en un plano focal diferente a las estructuras corticales de PalC::GFP.

SlaB se localiza en puntos corticales inmóviles estrechamente asociados a la membrana plasmática, y también mucho más abundantes en la región subapical. SlaB::GFP colocaliza muy parcialmente con AbpA::mRFP, aunque el número de puntos que se marcan con SlaB::GFP es mucho mayor que los observados con AbpA²⁸. Mediante reemplazamiento, se generó una cepa que expresa SlaB::mRFP a niveles fisiológicos, dado que dicha cepa no había sido construida. La localización de SlaB::mRFP es indistinguible de la de SlaB::GFP²⁸ (Figura CR.-31 A). Sin embargo, al igual que sucedía con Abp::mRFP, el collar subapical de SlaB::mRFP desaparecía con el cambio del pH del medio de ácido a alcalino, de manera que, a pH alcalino, los puntos corticales están distribuidos a lo largo de toda la hifa (Figura CR.-31 A).

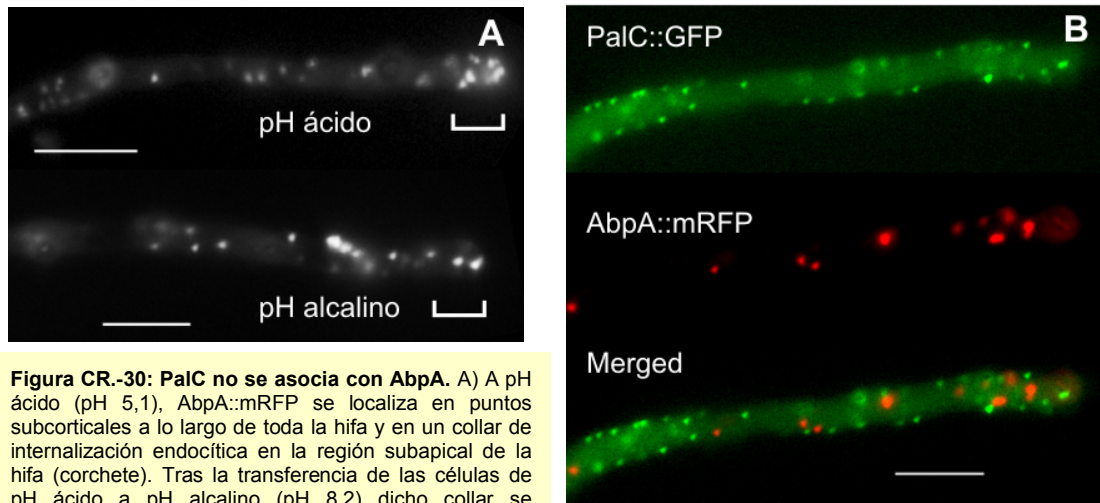


Figura CR.-30: PalC no se asocia con AbpA. A) A pH ácido (pH 5,1), AbpA::mRFP se localiza en puntos subcorticales a lo largo de toda la hifa y en un collar de internalización endocítica en la región subapical de la hifa (corchete). Tras la transferencia de las células de pH ácido a pH alcalino (pH 8,2) dicho collar se desorganiza (corchete). B) Doble marcaje con PalC::GFP y AbpA::mRFP. Las estructuras corticales a las que la proteína PalC::GFP se recluta no se asocian con AbpA::mRFP. Las barras representan 5 µm.

Se cruzó la cepa *slaB::mRFP* con una cepa que expresaba PalC::GFP y se seleccionaron de la progenie las cepas que coexpresaban PalC::GFP y SlaB::mRFP. El análisis de estas cepas al microscopio de fluorescencia demostró que, una fracción apreciable (~30%) de las estructuras corticales de PalC::GFP parecen estar asociadas a las estructuras que se marcan con SlaB::mRFP (Figura CR.-31 B), Aunque mis experimentos no pueden demostrar si dicha asociación tiene un significado fisiológico, el hecho de que parte de las estructuras corticales de PalC se asocien a SlaB y no a AbpA, sugiere que, de reclutarse PalC a sitios de endocitosis, lo haría en una fase temprana del ensamblaje de los complejos multiproteicos de internalización.

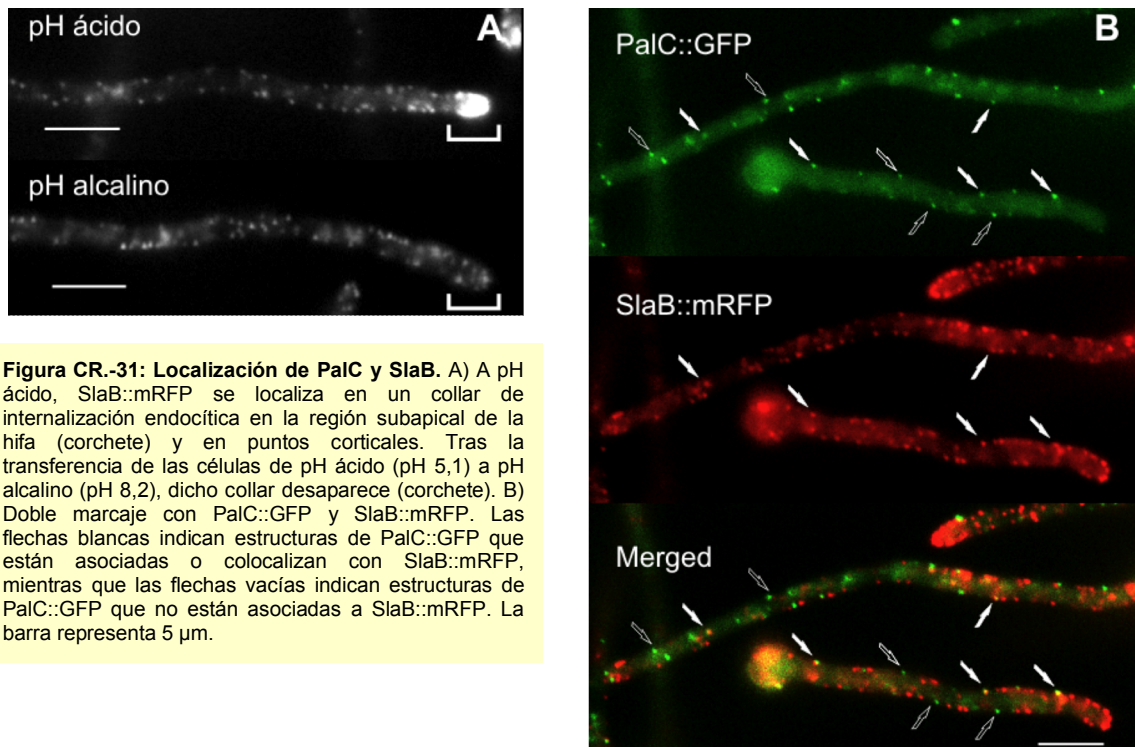


Figura CR.-31: Localización de PalC y SlaB. A) A pH ácido, SlaB::mRFP se localiza en un collar de internalización endocítica en la región subapical de la hifa (corchete) y en puntos corticales. Tras la transferencia de las células de pH ácido (pH 5,1) a pH alcalino (pH 8,2), dicho collar desaparece (corchete). B) Doble marcaje con PalC::GFP y SlaB::mRFP. Las flechas blancas indican estructuras de PalC::GFP que están asociadas o colocalizan con SlaB::mRFP, mientras que las flechas vacías indican estructuras de PalC::GFP que no están asociadas a SlaB::mRFP. La barra representa 5 µm.

4.5.2 LAS MUTACIONES *didB*Δ O *rabA*Δ NO AFECTAN A LA LOCALIZACIÓN DE PalC EN ESTRUCTURAS CORTICALES

En *A. nidulans*, los endosomas tempranos son estructuras citosólicas que se marcan con FM4-64 y que se mueven bidireccionalmente a una velocidad de 2-3 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ ²³⁸ (Figura CR.-32 A), mediante motores dependientes de microtúbulos ²⁵⁶. Estos endosomas tempranos se caracterizan por contener la proteína RabA^{Rab5}. Aunque las estructuras en las que se localiza PalC::GFP son estáticas, y por lo tanto no se corresponden a endosomas tempranos, el tráfico a través de éstos podría participar de un modo indirecto en la localización de PalC::GFP.

A diferencia de las estructuras corticales a las que se asocia PalC::GFP, los endosomas tardíos se mueven, aunque localmente, y son citosólicos. Sin embargo, la maduración de los endosomas tardíos en cuerpos multivesiculares podría también afectar a la localización de PalC::GFP. Esta maduración requiere los complejos ESCRT y sus proteínas reguladoras. DidB es el ortólogo en *A. nidulans* de Did2p de *S. cerevisiae*, que regula la función de Vps4 ^{46,82,85,93}. Al contrario de lo que sucede con otras proteínas del ESCRT-III, DidB no es esencial ¹⁸², pero, en *S. cerevisiae*, la delección de *DID2* provoca la formación de cuerpos multivesiculares anormales, debido a que los complejos ESCRT no se desensamblan y se quedan anclados a las membranas de los endosomas

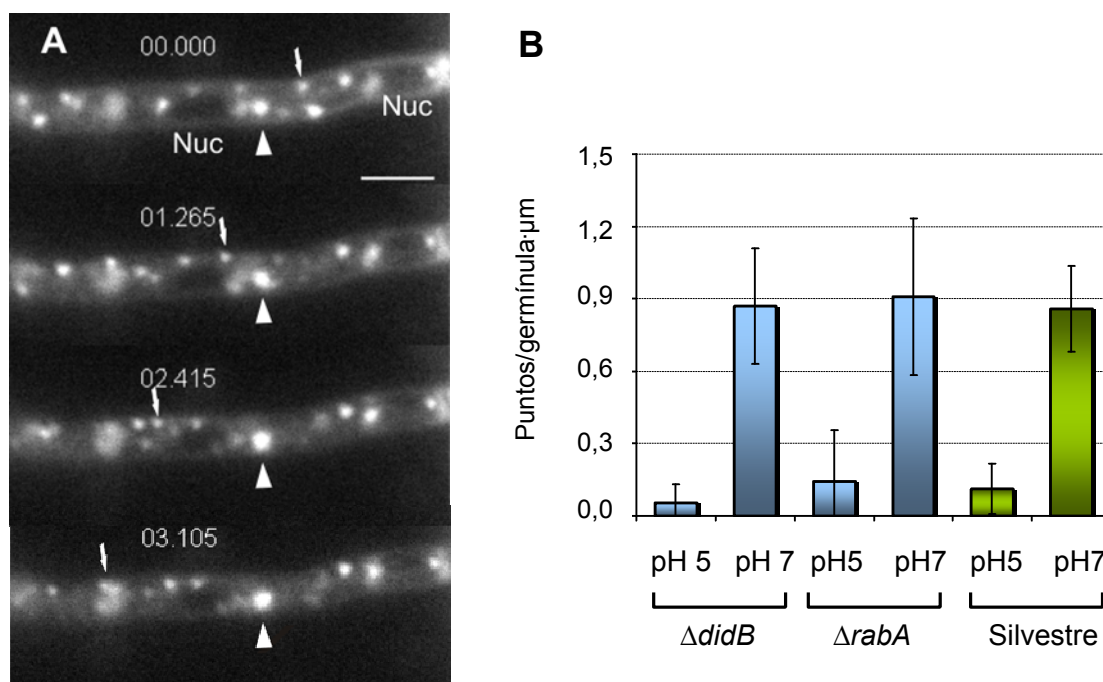


Figura CR.-32: Endosomas en *A. nidulans*. A) Marcaje de endosomas con FM4-64 al cabo de diez minutos de cargar las células con el trazador. Las germinulas se cultivaron en una cámara de incubación a 28 °C. El tiempo transcurrido entre cada fotograma aparece indicado como sec:msec. En la imagen se señala con una flecha un endosoma temprano que se mueve cerca del córtex, mientras que con un triángulo se indica un endosoma tardío, de mayor tamaño y estático. La barra representa 5 μm . B) Cuantificación de las estructuras corticales de PalC en estirpes *didB*Δ y *rabA*Δ. Las barras representan el error estándar.

Para comprobar si el tráfico a través de los endosomas tempranos o tardíos está implicado de alguna manera en la localización de PalC, se construyeron cepas que expresan PalC::GFP con las mutaciones *didBA* o *rabA* Δ . Ninguna de estas deleciones afectó a la densidad (número de puntos/ μ m) o a la intensidad (nivel de fluorescencia) (resultados no mostrados) de las estructuras corticales de PalC::GFP (Figura CR.-32 B). Por tanto, la localización de PalC no parecería depender del tráfico normal a través del sistema endosomal.

4.5.3 LOCALIZACIÓN DE Vps32

PalC interacciona con Vps32, una proteína que se asocia a la membrana de los endosomas ^{47,70,75,76,79,83,181}. Esta interacción tiene relevancia fisiológica, ya que mutaciones en PalC que previenen la unión con Vps32 dan lugar a un fenotipo de mimesis de acidez (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.4.3). Sin embargo, la localización de PalC en estructuras corticales en respuesta al pH no se corresponde con endosomas, por lo que se decidió estudiar la localización de Vps32. El análisis de la localización de Vps32 planteaba ciertos problemas dado que, en *S. cerevisiae* y en células de mamíferos, la fusión de la GFP en el extremo C-terminal de Vps32/CHMP4 da lugar a una proteína que no es funcional ⁴⁶ y, aunque la deleción de *VPS32* en levadura es viable, en *A. nidulans* *vps32* es un gen esencial (Calcagno et al. resultados sin publicar). Por ello, se intentó obtener una cepa que expresase la proteína Vps32 marcada en su extremo N-terminal con mRFP desde un transgén basado en el promotor fuerte *gpdA*^{mini}, integrado en el locus *pyrA*. Sin embargo, todos los transformantes (n=28) obtenidos habían corregido la mutación *pyrA4* mediante un doble sobrecreuzamiento que excluía el transgén (resultados no mostrados), lo que sugirió que también el marcaje en el extremo N-terminal previene la función (esencial) de la proteína. Posiblemente, el etiquetado N-terminal previene la unión a membranas (*vide infra*) y, dado que Vps32 oligomeriza ⁷⁶, la sobreexpresión de esta proteína genera un dominante negativo letal.

La unión de GFP a Vps32p en su extremo C-terminal da lugar a una proteína no funcional, aunque en esta posición la GFP no previene la unión de Vps32 a membranas ^{73-75,251}. Por tanto, se generó una estirpe que, para evitar efectos dominantes negativos, expresa a niveles fisiológicos Vps32::mRFP, mediante un transgén *vps32^p::vps32::mRFP* integrado en el locus *vps32* (Figura CR.-33).

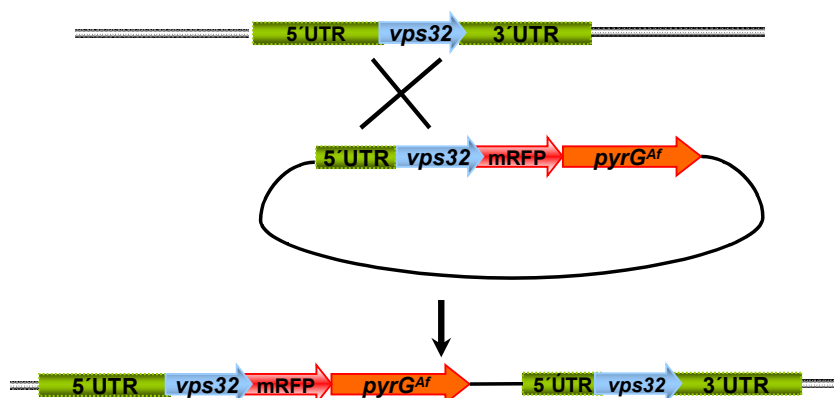


Figura CR.-33: Representación esquemática de la integración de la construcción *vps32^p::vps32::mRFP* en el locus *vps32*.

Se seleccionaron, mediante Southern-blot, los transformantes que habían integrado el transgén en el locus *vps32* (Figura CR.-34 A y B), y el análisis por western-blot de estos transformantes demostró que la proteína de fusión tenía el tamaño esperado (Figura CR.-34 C). Al microscopio de epifluorescencia se observó que Vps32::mRFP se localiza en estructuras que se mueven bidireccionalmente, similares a los endosomas tempranos que se marcan con FM4-64 y que contienen a GFP-RabA^{Rab5} (Figura CR.-35 A, flecha), así como en puntos citoplásmicos de mayor tamaño y relativamente estáticos, que posiblemente representen endosomas tardíos y/o vacuolas de pequeño tamaño (Figura CR.-35 A, flecha vacía). La proteína de fusión marca también la membrana de las vacuolas de gran tamaño, con mayor intensidad en ciertas regiones adyacentes a éstas (Figura CR.-35 A, triángulo). La Dra. Olga Rodríguez había observado que, al sobreexpresar la proteína Vps32::GFP bajo el control del promotor *alcA* [en etanol al 1% (v/v) como única fuente de carbono durante 2 horas a 25°C], ésta aparece formando acúmulos inmóviles adyacentes a vacuolas, que colocalizan con FM4-64¹⁸².

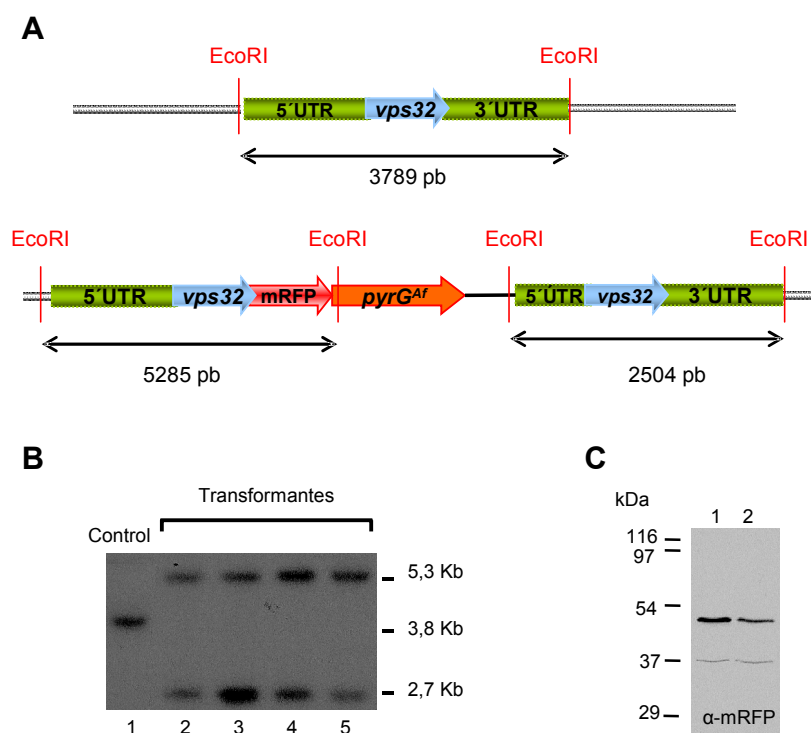


Figura CR.-34: Análisis por Southern y western-blot de los transformantes *vps32^o::vps32::mRFP*. A) Esquema que representa los fragmentos esperados tras detección con la sonda 5' UTR::Vps32 en el análisis por restricción con EcoRI del DNA de los transformantes que han integrado el transgén *vps32::mRFP::pyrG^{Ac}*. B) Análisis por Southern-blot del DNA de los transformantes obtenidos. En la autorradiografía se observan en los carriles 2-5 las dos bandas que se esperan de la integración por recombinación homóloga del plásmido. C) Análisis por western-blot de dos clones que llevan el transgén *vps32^o::vps32::mRFP* en copia única. Se utilizó un anticuerpo α-mRFP para detectar Vps32::mRFP.

La unión de Vps32 a membranas está regulada por un dominio autoinhibitorio, localizado en la región C-terminal^{73,74}. La fusión en el extremo C-terminal de Vps32 de la GFP previene la función de dicho dominio, por lo que Vps32 está permanentemente unida a membranas y el complejo ESCRT-III no se desensambla⁷⁵. Por tanto, la sobreexpresión de Vps32::GFP causa una alteración en la biogénesis de los MVBs, dando lugar a

acúmulos de membranas donde la proteína de fusión está retenida ^{76,79}. En la cepa *vps32::mRFP*, las regiones adyacentes a la membrana de la vacuola, que se marcan con más intensidad, podrían representar también estructuras que se forman debido al anclaje de Vps32::mRFP a la membrana de los endosomas .

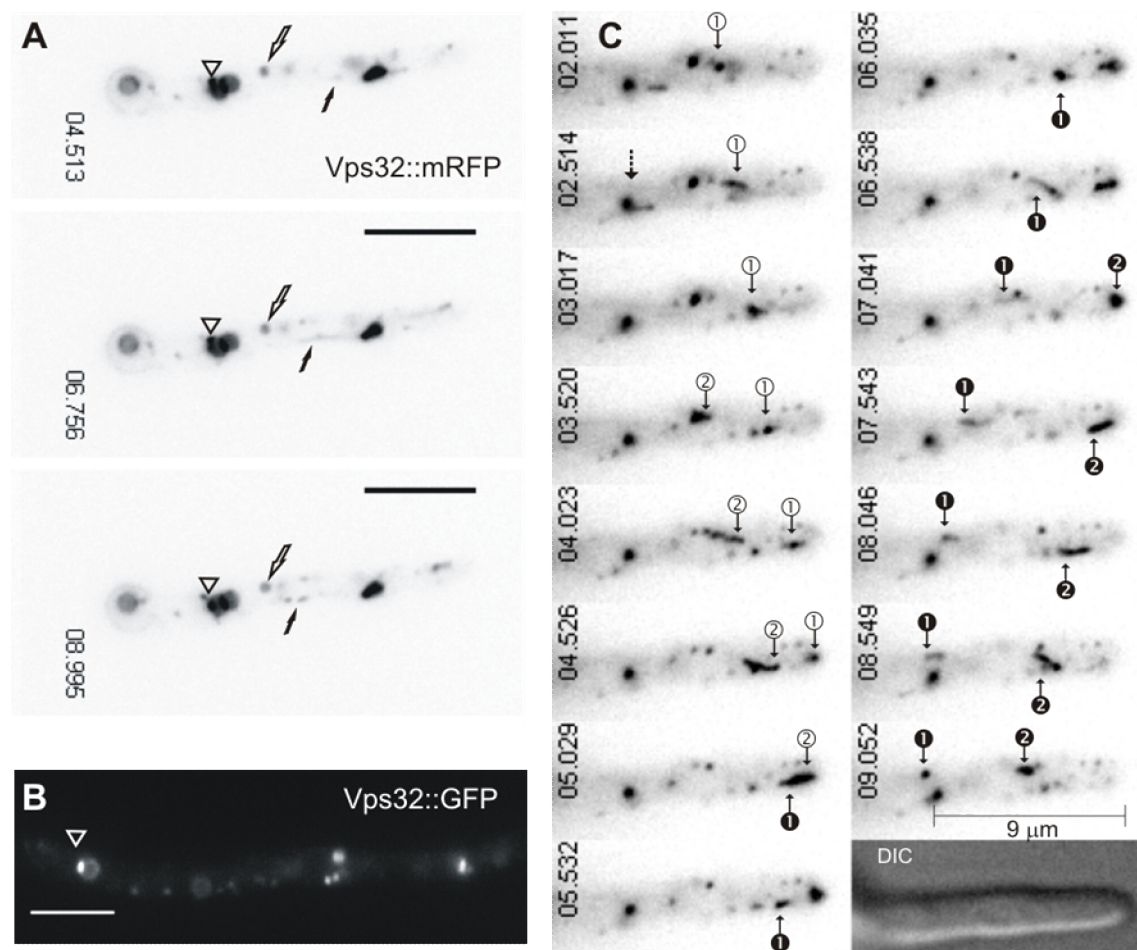


Figura CR.-35: Localización de Vps32. A) Localización de Vps32::mRFP en estructuras móviles (que se corresponden con endosomas tempranos; uno está señalado en la imagen con una flecha negra), en estructuras estáticas (que se corresponden con endosomas tardíos; uno ha sido señalado en la imagen con una flecha vacía) y en la membrana de la vacuola. En la imagen se observa la vacuola de la conidiospora basal y otras dos vacuolas situadas en el centro de la imagen, donde hay regiones con fluorescencia más intensa (una se ha señalado en la imagen como un triángulo). La barra representa 5 μm. B) Localización de Vps32::GFP en una germinula de una cepa *alcA^p::vps32::GFP* cultivada durante 30 minutos en condiciones de inducción. La localización de Vps32::GFP es similar a la localización de Vps32::mRFP. En la imagen aparece, indicado con un triángulo, una de las estructuras características asociadas a la membrana de una de las vacuolas. La barra representa 5 μm. C) Endosomas que contienen Vps32::GFP en una germinula de una estirpe *alcA^p::vps32::GFP* cultivada en fructosa como única fuente de carbono. Las imágenes se tomaron con la aplicación "stream acquisition" del programa MetaMorph, con 0,5 segundos de exposición. El tiempo transcurrido entre cada imagen se indica como sec.:msec. En las imágenes se observan dos endosomas que se mueven, primero, en sentido anterógrado y, posteriormente, en sentido retrógrado (señalados con las flechas 1 y 2. El color blanco de los círculos indica movimiento anterógrado y el color negro indica movimiento retrógrado). En la imagen se señala, como referencia, con una flecha punteada, un endosoma estático.

Para reducir el nivel de expresión de Vps32::GFP se cultivaron las germinulas en condiciones de no represión y no inducción, en un medio con de 0,1% (w/v) fructosa como única fuente de carbono, o se redujo el tiempo de inducción en etanol a 30 minutos. En estas condiciones, la localización de Vps32::GFP (Figura CR.-35 B) fue similar a la de Vps32::mRFP, lo que indica que la localización de estas dos proteínas de fusión en estructuras citosólicas estáticas y puntos móviles representa una localización fiable de Vps32. En la figura CR.-35 C, se muestra la localización de Vps32::GFP en germinulas cultivadas en fructosa como única fuente de carbono. Los cuatro puntos que aparecen señalados se mueven a una velocidad aproximada entre 2,2 y 2,7 μm por segundo, semejante al movimiento debido a los motores moleculares dependientes de microtúbulos. La trayectoria que siguen muchas de estas estructuras alcanza el córtex de la célula. Esta proximidad al córtex podría facilitar una hipotética interacción transitoria entre las estructuras corticales, en las que se encuentra PalC, y los endosomas, que contienen a Vps32.

4.5.4 Vps32::GFP INTERACCIONA CON PalC

La localización subcelular de PalC en las estructuras corticales responde al pH ambiental. Una posibilidad que explicaría la paradoja de que PalC se localice en estas estructuras, mientras que Vps32 tiene localización endosomal^{39,70,75,181}, sería que PalC reclutase a Vps32 a estas estructuras corticales de manera dependiente de la señal de pH. Sin embargo, en experimentos de cambio de pH similares a los realizados para estudiar la localización de PalC::GFP, no se observó ningún efecto del pH en la localización de Vps32, tanto en cepas *vps32::GFP* como *vps32::mRFP*.

Dado que se había demostrado que la sobreexpresión de Vps32::GFP causa un fenotipo atenuado de mimesis de acidez¹⁸², y que la región de interacción de CHMP4 (homóloga humana de Vps32) con la proteína con dominio Bro1, ALIX, se encuentra en la α -hélice C-terminal²⁰⁰, había que descartar la posibilidad de que el marcaje C-terminal de Vps32 afectase a la interacción con PalC. Para determinar si la proteína de fusión Vps32::GFP procedente de células de *A. nidulans* era competente para unirse a PalC, se usó GST::PalC como cebo en experimentos de pull-down con extractos proteicos de una cepa *alcA^p::vps32::GFP*. Como controles se emplearon extractos de estirpes que expresaban las proteínas GFP::RabA^{Rab5} o GFP, también bajo el control del promotor *alcA*. Los extractos se incubaron en presencia de glutatión-Sepharosa y las proteínas que copurificaron con el cebo se analizaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante ensayos de western-blot. De esta forma, se comprobó que Vps32::GFP copurifica eficientemente con GST::PalC (Figura CR.-36, carriles 4 y 11), mientras que ni GFP-RabA^{Rab5}, ni GFP copurifican con este cebo (Figura CR.-36, carriles 5-6 y 12-13, respectivamente). Además, la proteína GST no retuvo a Vps32::GFP (Figura CR.-36, carriles 7 y 14), lo que demuestra que la interacción entre GST::PalC y Vps32::GFP es específica. La interacción se produjo tanto con extractos de *A. nidulans*, preparados con una concentración de Tritón X-100 al 0,5%, como cuando el ensayo se hizo en ausencia de detergente (Figura CR.-34). Por tanto, al igual que sucedía en los ensayos de pull-down con extracto proteicos de *E.coli*, el aumento de la hidrofobicidad en el tampón no afecta a la interacción. Estos datos corroboran la interacción de PalC con Vps32 y validan los resultados descritos anteriormente de la localización de Vps32.

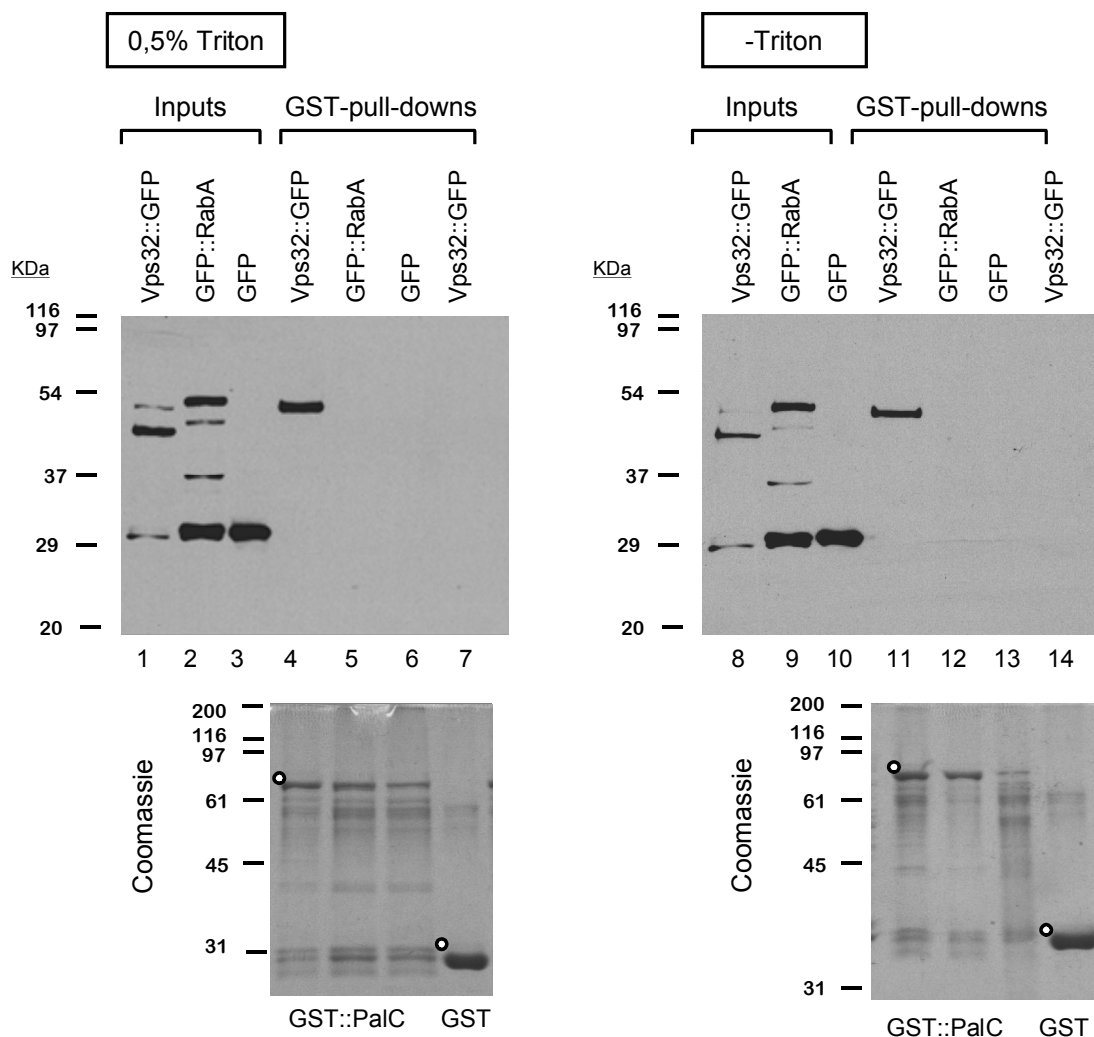


Figura CR.-36: Vps32::GFP interacciona con GST::PalC. Extractos de *A. nidulans* preparados con y sin Triton X-100 se incubaron con un extracto de *E. coli* que contenía GST::PalC en presencia de perlas de glutatión-Sepharosa. Las proteínas unidas a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por western-blot con un anticuerpo anti-GFP (carriles 4-7 y 11-14, arriba). Los cebos GST::PalC o GST (señalados con un círculo blanco, abajo) se detectaron por tinción con Coomassie. Los "inputs" representan el 2% de la proteína empleada en el ensayo.

Hay que señalar que en los ensayos de pull-down solamente se detectó, mediante western anti-GFP, la proteína Vps32::GFP intacta. Los carriles 1-3 y 8-10 de la figura CR.-36 corresponden a los extractos de partida de las cepas que expresan Vps32::GFP, GFP::RabA y GFP, respectivamente. En los carriles 1 y 2, y 8-10, aparecen distintas bandas de degradación. La banda de menor tamaño seguramente se corresponde con la proteína GFP, [compárese con la movilidad de GFP (carriles 3 y 10)], mientras que el resto son fragmentos de las proteínas de fusión que han perdido regiones en posición N-terminal, pero mantienen la GFP. En el caso de Vps32::GFP se detecta débilmente la banda correspondiente a la proteína intacta, por debajo de la cual migra una segunda banda mayoritaria. El hecho de que la proteína Vps32::GFP intacta se purifique selectivamente en los ensayos de pull-down demuestra que la región N-terminal de Vps32 juega un papel directo o indirecto (por

ejemplo, si la delección de dicha región afectase al plegamiento de la proteína, de manera que no fuese capaz de unirse al dominio Bro1 de PalC) en la unión a PalC.

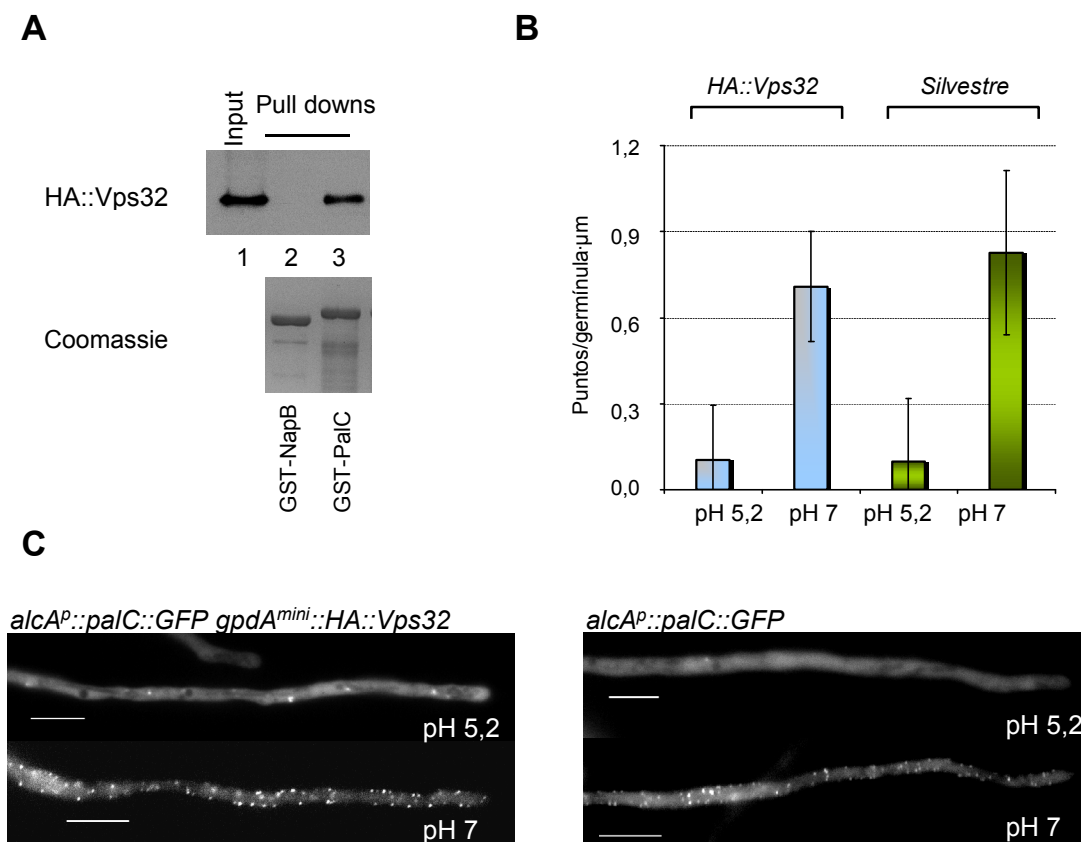
Por otra parte hay que indicar que, los extractos proteicos analizados en la figura CR.-34 fueron incubados en las mismas condiciones que las muestras del pull-down, lo que facilita la degradación de las proteínas de fusión con GFP, aunque en los análisis de extractos proteicos sin dicho paso de incubación (véase Material y Métodos, apartado 3.6.4) se detectaron también las dos bandas de degradación, en este caso la forma mayoritaria fue la proteína intacta (resultados no mostrados). Por tanto, el fenotipo que se observa al microscopio en la cepas que expresan Vps32::GFP se debe a la forma intacta, y no a un fragmento, de la proteína.

4.5.5 LA SOBREEXPRESIÓN DE Vps32 NO AFECTA A LA LOCALIZACIÓN DE PalC::GFP

Al no haber encontrado un efecto patente del pH ambiental en la localización de Vps32, se probó si la sobreexpresión de Vps32 afectaba a la localización de PalC. Se obtuvieron estirpes que sobreexpresan Vps32, marcada en su extremo amino-terminal con el epítipo HA o sin marcar, bajo el promotor constitutivo *gpdA^{mini}*. El marcaje en el extremo N-terminal de Vps32 permitió comprobar, por análisis de western-blot, la expresión del transgén, mientras que la expresión de Vps32 sin marcar sirvió para descartar que el posible efecto de la sobreexpresión de Vps32 se debiera a la expresión de una proteína mutante. En medio sólido, estas dos cepas crecen y esporulan de forma normal, y en condiciones diagnósticas del sistema de regulación por pH ambiental su fenotipo es indistinguible del de una cepa silvestre (resultados no mostrados). Por tanto, el aumento de los niveles de expresión de Vps32 o de HA::Vps32 no afecta a la ruta de pH. En este caso, no se puede determinar si la proteína de fusión HA::Vps32 es funcional, dado que en la cepa se expresa la proteína Vps32 endógena (recuérdese que *vps32* es esencial), pero dado que su expresión a partir de *gpdA^{mini}* no da lugar a ningún fenotipo detectable en medio sólido, al contrario de cuando se sobreexpresa Vps32::GFP (*vide supra*, una leve sensibilidad a pH alcalino), todo parece indicar que la proteína es funcional. Como Vps32::GFP, la proteína HA::Vps32, presente en extractos proteicos, copurifica con el cebo GST::PalC (Figura R- 37 A).

A pesar de que la sobreexpresión de Vps32 no da lugar a un fenotipo de pH detectable en los tests diagnósticos en placa, sí podría promover la localización de PalC::GFP en las estructuras corticales, detectable mediante un aumento del número o la intensidad de dichas estructuras. Por ello, las estirpes *gpdA^{mini}::HA::vps32* y *gpdA^{mini}::vps32* se cruzaron con una cepa *alcA^p::palC::GFP* y seleccionaron de la progenie clones que coexpresaban PalC::GFP y HA::Vp32 o Vps32. La observación al microscopio de fluorescencia de estas cepas, en experimentos de cambios de pH ácido a pH alcalino, no reveló diferencia alguna en la localización de PalC::GFP (Figura.-37 B y C).

Figura CR.-37: La sobreexpresión de Vps32 no afecta a la localización de PalC::GFP. A) Ensayo de pull-down con extractos de células de *A. nidulans* que expresan la proteína HA::Vps32 y extractos de *E. coli* con el cebo GST::PalC. Tras mezclarse ambos extractos, éstos se incubaron con perlas de glutatión-Sepharsa. Las proteínas unidas a la resina se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por western-blot con un anticuerpo anti-HA (carriles 2 y 3, arriba). Los cebos GST::PalC o GST::NapB se detectaron por tinción con Coomassie. El "input" representa el 2% de la proteína empleada en los ensayos. B) Cuantificación de los puntos corticales en condiciones ácidas y en condiciones alcalinas en una estirpe *alcA^p::palC::GFP gpdA^{mini}::HA::Vps32* (azul; pH 5,2: 0,1 puntos/germinula, n=20, pH 7: 0,8 puntos/germinula, n=20) y en una estirpe control *alcA^p::palC::GFP* (verde; pH 5,2: 0,1 puntos/germinula, n=20; pH 7: 0,76 puntos/germinula, n=20). C) Imágenes de células *alcA^p::palC::GFP*; *gpdA^{mini}::HA::Vps32* y *alcA^p::palC::GFP* a pH ácido (pH 5,2) y neutro (pH 7).



4.6 EL MOTIVO DI-TIROSINA C-TERMINAL

La proteína PalC y sus homólogos en otros hongos *euscomycetes* y *basidiomycetes* se caracterizan por tener en su extremo C-terminal dos residuos aromáticos, generalmente dos tirosinas (i.e. en *A. nidulans*) o bien una tirosina y una fenilalanina ¹³⁵, lo que recuerda al motivo difenilalanina C-terminal que presentan ciertas proteínas transmembrana tipo I y que se requiere para el transporte del retículo endoplásmico (ER) al Golgi ²⁵⁷.

De los 507 aminoácidos que tiene PalC, los 449 residuos N-terminales se corresponden con el dominio Bro1, mientras que en los 54 residuos C-terminales restantes existe una región rica en prolina, que comprende desde el aminoácido 450 al 473 e incluye a la Tyr454 mencionada anteriormente, así como una región rica en residuos de carácter ácido y, finalmente, el motivo ditirosina (Figura CR.-38). La región rica en prolina está conservada en otros euscomycetes, pero aguas abajo de dicha región no existe similitud entre la secuencia de PalC y el resto de las secuencias del alineamiento de la figura CR.-38. En cambio, el motivo ditirosina está universalmente conservado en *ascomycetes* (véase datos de *S. cerevisiae* de YGR122w más adelante), *basidiomycetes* y en el hongo *zygomycete Rhizopus oryzae*. Debido a esto, se decidió estudiar la función de este motivo en la ruta de pH.

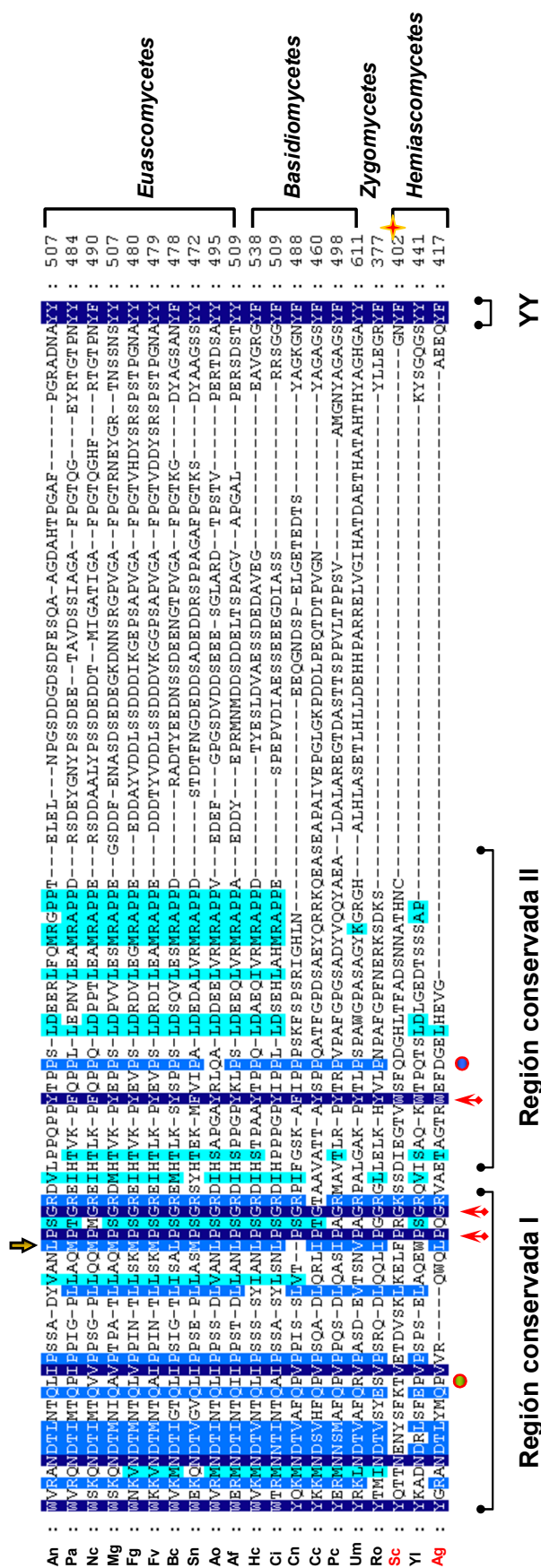


Figura CR-38: Alineamiento de la región C-terminal de PalC en hongos filamentosos y de las proteínas YGR122wp de *S. cerevisiae* y AAR081C de *Ashbya gossypii*. Los residuos resaltados en azul oscuro tienen más de un 90 % de similitud, los resaltados en azul claro entre un 50 % de similitud y los resaltados en turquesa entre un 30 % a un 50 % de similitud (de acuerdo con la matriz Blossum 62). Las posiciones de los residuos cuya sustitución o delección afecta a la interacción con Vps32 (flechas rojas), así como las de los truncamientos en los alelos *palC131* (círculo azul) y *palC159* (círculo verde), están indicadas. Las regiones conservadas I y II se corresponden con las indicadas en Resultados, Capítulo I, apartado 4.3. YY: motivo diaromático C-terminal. *Euscomycetes*: An: *A. nidulans*, Pa: *Posadospora anserina*, Nc: *Neurospora crassa*, Mg: *Magnapotha grisea*, Fg: *Fusarium graminearum*, Fv: *Botrytis cinerea*, Sn: *Septoria nodorum*, Ao: *A. oryzae* Af: *A. fumigatus*, Hc: *Histoplasma capsulatum*, Ci: *Coccidioides immitis*. *Basidiomycetes*: Cn: *Cryptococcus neoformans*, Cc: *Coprinus cinereus*, Pc: *Phanerochaete chrysogenum*, Um: *Ustilago maydis*. *Zygomycetes*: Ro: *Rhizopus oryzae*. *Hemiascomycetes*: Sc: *S. cerevisiae*, Yi: *Y. lipolytica*, Ag: *Ashbya gossypii*.

Para ello, se generaron alelos de PalC que codifican para proteínas mutantes con dos alaninas en posición C-terminal en sustitución de las dos tirosinas (*palC301*), o con la delección de estos dos residuos (*palC302*), siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo I, apartado I, por lo que las proteínas mutantes están etiquetadas con tres copias del epítipo HA en su extremo C-terminal, lo que permite comparar su nivel de expresión y estabilidad con la proteína PalC::HA₃ silvestre (codificaba por el alelo *palC300*). El reemplazamiento génico del alelo silvestre por los alelos *palC301* y *palC302* se realizó en una estirpe que contenía el alelo *pacC900*, que codifica para la proteína Myc₃::PacC.

4.6.1 LA DELECCIÓN O LA SUSTITUCIÓN DE LAS DITIROSINAS C-TERMINALES DE PalC POR ALANINAS CAUSA UN FENOTIPO MUY LEVE DE MÍMESIS DE ACIDEZ

Se realizaron pruebas de crecimiento en medios diagnósticos de las cepas mutantes *palC301* y *palC302* para analizar su fenotipo. En la Figura CR.-39 A se muestra cómo la cepa control Δ *palC* presenta el fenotipo típico de mimesis de acidez, mientras que la estirpe que expresa PalC::HA₃ se comporta como el silvestre. El fenotipo de las cepas que expresan PalC^{Y506A,Y507A}::HA₃ (cepa *palC301*) o PalC^{Y506A,Y507Δ}::HA₃ (cepa *palC302*) a pH alcalino es prácticamente indistinguible del de la cepa *palC::HA₃*. Sin embargo, *palC301* y *palC302* son marginalmente más sensibles a molibdato y a cloruro de litio que el silvestre (compárese el comportamiento de las tres estirpes en las columnas 6-11 de la figura CR.-39 A). La detección por western-blot de las proteínas mutantes en extractos proteicos de dichas cepas demuestra que sus niveles son similares a los de la proteína PalC::HA₃ (Figura CR.-39 D), lo que nos indica que el leve efecto que se observa debido a las mutaciones no es consecuencia de una menor estabilidad y/o disminución en los niveles de expresión de las proteínas mutantes.

Dado que el fenotipo que se observa es muy débil, para intentar corroborar que se trata de un fenotipo genuino y que el pequeño efecto no se debía sencillamente a una diferencia aleatoria en el inóculo, se realizó un ensayo de dilución (Figura CR.-39 B), incrementándose la concentración de cloruro de litio y de molibdato en el medio con el objetivo de maximizar las diferencias de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. De nuevo no se observó ningún efecto a pH alcalino, pero en las placas con cloruro de litio y con molibdato las cepas mutantes esporularon más lentamente y el diámetro de sus “parches” fue ligeramente menor al de las cepas silvestres (Figuras CR.-39 B, columnas 1 y 3 silvestres, y 2 y 4 mutantes). En las placas con neomicina la diferencia entre las cepas silvestres y las mutantes fue prácticamente indetectable, aunque parecían crecer marginalmente mejor las cepas mutantes (Figura CR.-39 B, columnas: 1 y 3 silvestres, y 2 y 4 mutantes). Cuando la estirpe *palC301* se cruzó con una estirpe silvestre la ligera sensibilidad a molibdato de este parental segregó mendelianamente (Figura CR.-39 C).

Por tanto, a pesar de estar estrictamente conservadas, el papel de las tirosinas en la ruta de pH, es aparentemente marginal según los ensayos de crecimiento.

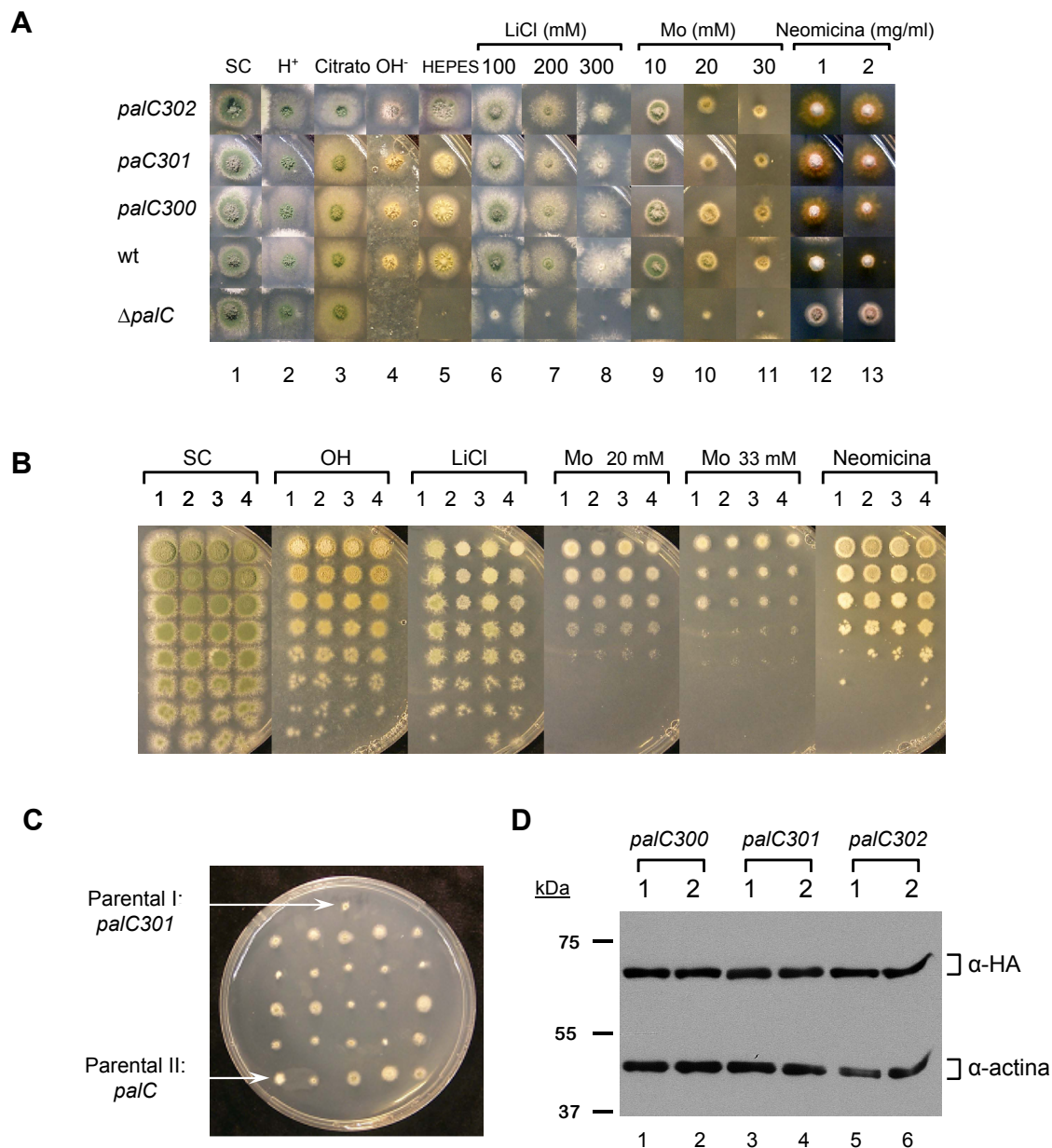


Figura CR.-37: Análisis fenotípico de las estirpes *palC301* y *palC302*. A) Prueba de crecimiento en medio sólido en la que se comparan las estirpes *palC301* y *palC302* con una estirpe *palC300*, con una estirpe silvestre y con una estirpe *palCΔ*. Las placas contienen MMA con glucosa al 1% como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada estirpe. SC: medio sintético completo; H⁺: placas con 500 mM NaH₂PO₄ (pH~5); Citrato: placas con 50 mM citrato sódico; OH⁻: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8); HEPES: placas con 100 mM HEPES ajustado a pH 8,4 con NaOH. Las concentraciones de LiCl, Molibdato de Sodio (Mo) y Neomicina aparecen indicadas en la figura. B) Test fenotípico en la que los inóculos se hicieron a partir de diluciones seriadas de una solución con la misma concentración de esporas para cada una de las estirpes. La densidad de colonias decrece de arriba hacia abajo. Las filas 1 y 3 se corresponden con dos clones independientes que expresan la proteína PalC::HA₃ (*palC300*), mientras que las filas 2 y 4 se corresponden con dos clones independientes que expresan la proteína PalC^{Y506A,Y507A}::HA₃ (*palC301*). SC y OH⁻ son placas con las mismas características que en A); LiCl: placas con 300 mM de LiCl; Neomicina: placas con 2 mg/ml de neomicina. C) Prueba de crecimiento en medio en SC con 33 mM de molibdato sódico de los descendientes de un cruce entre una cepa silvestre y la cepa *palC301*. D) Análisis por western-blot de las estirpes que expresan PalC^{Y506A,Y507A}::HA₃ (*palC301*) (carriles 3 y 4), PalC^{Y506Δ,Y507Δ}::HA₃ (*palC302*) (carriles 5 y 6) y PalC::HA₃ (*palC300*) (carriles 1 y 2). Las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo α-HA. Como control de carga se usó un anticuerpo α-actina.

4.6.2 EL PROCESAMIENTO DE PacC⁷² EN LA CEPA *palC301*

Los ensayos de crecimiento en medios diagnósticos indican que las mutaciones en el motivo ditirosina no previenen el funcionamiento de la ruta de pH, pero no indican cuál sería el papel de este motivo en la respuesta rápida a la alcalinización del pH del medio. Para estudiar dicha respuesta rápida, se analizó, por western-blot, la cinética del procesamiento de PacC en los fondos genéticos *palC300* y *palC301*. El procesamiento en la estirpe *palC300* es indistinguible de una cepa silvestre (Resultados; Capítulo I; apartado 4.1.2).

En ambas estirpes, *palC300* y *palC301*, PacC⁷² es procesado secuencialmente a PacC⁵³ y a PacC²⁷ tras el cambio a condiciones alcalinas (Figura CR.-40 A). En la estirpe *palC300*, tras 15 minutos de incubación en condiciones alcalinas, PacC⁵³ es la forma mayoritaria, aunque también se detectan tanto PacC⁷² como PacC²⁷. Al cabo de 30 o 60 minutos, PacC⁷² deja de detectarse, y la forma mayoritaria es PacC²⁷ (Figura CR.-40 A, carriles 1-4). Tras dos horas a pH alcalino, PacC²⁷ sigue siendo la forma mayoritaria, PacC⁵³ apenas se detecta y reaparece PacC⁷², que procede de síntesis de *ново* (Figura CR.-40 A, carril 5). En la estirpe *palC301* la cinética es muy parecida, aunque en este caso, tras 15 minutos, la forma mayoritaria es PacC⁷², y no se detecta PacC²⁷. (Figura CR.-40 A, compárese carriles 2 y 7). Puesto que la única diferencia en la cinética de procesamiento entre las dos estirpes se detectó a los 15 minutos, se incrementó el número de muestras analizadas durante los primeros 30 minutos tras el cambio a pH alcalino. De esta manera, se comprobó que en la estirpe *palC300*, a los 24 minutos, apenas se detecta PacC⁷², mientras que PacC⁵³ aparece a los cuatro minutos (Figura CR.-40 B, carriles 2) y es la forma mayoritaria de PacC a los 12-16 minutos, cuando se empieza a detectar PacC²⁷ (Figura CR- 40 B, carriles 4-6). En la cepa *palC301* el procesamiento de PacC⁷² está algo más retrasado, de manera que PacC⁷² es la forma mayoritaria durante los primeros 24 minutos (Figura CR.-40 B, carriles 8-13), mientras que PacC⁵³ no aparece hasta los 8 minutos (Figura CR.-40 B, carril 10). Por tanto, la sustitución de las dos tirosinas tan sólo retrasa ligeramente el procesamiento de PacC⁷² a PacC⁵³, pero la cinética de procesamiento es muy parecida a la de una cepa silvestre, lo que concuerda con los tests diagnósticos en placa, que indican que el papel que juegan las tirosinas C-terminales de PalC en el sistema de regulación por pH ambiental es relativamente dispensable.

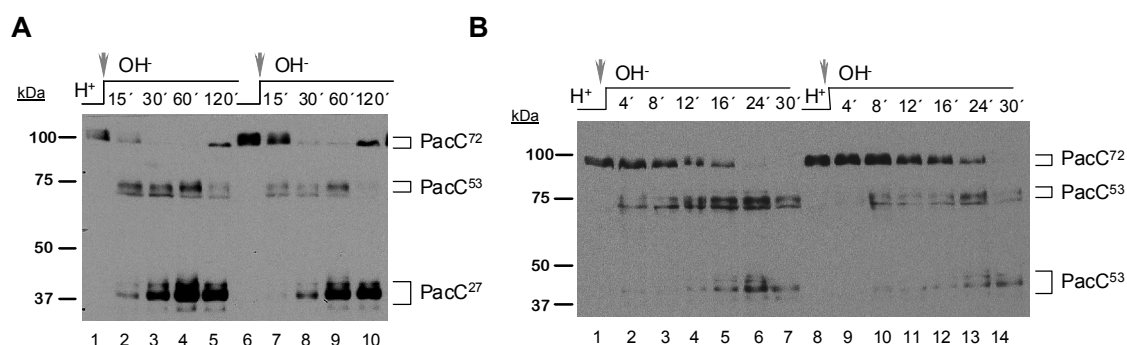


Figura CR.-40: El procesamiento de PacC en la cepa *palC301* (*palC^{Y506A,Y507A}::HA₃*). Células *palC300 pacC900* (A: carriles 1-5 o B: carriles 1-7) y *palC301 pacC900* (A: carriles 6-10 o B: carriles 8-14) cultivadas en condiciones ácidas (H⁺: pH 4,5), se transfirieron a condiciones alcalinas (OH⁻: pH 8,4). Las muestras tomadas en los tiempos que aparecen indicados se analizaron con anticuerpos α-Myc, para comprobar el procesamiento de pacC.

4.7 YGR122Wp ES EL ORTÓLOGO DE PalC EN *S. cerevisiae*

Aunque se habían identificado ortólogos de PalC en *ascomycota*, *basidiomycota* y *zygomycota*¹³⁵, al comienzo de este estudio no se había encontrado un ortólogo ni en *S. cerevisiae* ni en otros hongos *hemiascomycetes*. Este trabajo se revisó mediante la búsqueda de proteínas de *S. cerevisiae* que tuviesen el motivo diaromático C-terminal y fuesen capaces de interactuar con Vps32. Se encontró que el producto del gen *YGR122W* (cuyo homólogo sinténico en *Ashbya gossypii* es *AAR081C*) cumple estos requisitos (Figura CR.-36). A pesar de que *A. gossypii* y *S. cerevisiae* están estrechamente relacionadas, la identidad de secuencia entre *AAR081C* y *YGR122w* es relativamente baja (26% de identidad), lo que explica por qué no se detectó mediante búsquedas de similitud de secuencia un ortólogo de PalC en hongos *hemiascomycetes*.

En análisis de doble híbrido a gran escala, *YGR122Wp* interactúa con Vps32p^{115,247}. De hecho, esta proteína no caracterizada se requiere, como otros genes de la ruta *RIM*, para la activación de Rim101p, ortólogo en levaduras de PacC^{113,163}. En el experimento de la figura CR.- 41 se demuestra que *ygr122wΔ* da lugar a un fenotipo de hipersensibilidad a litio, característico de las mutaciones de pérdida de función en la ruta *RIM*.

Por tanto, estos datos indican que *YGR122w* es el ortólogo de *palC* en *S. cerevisiae*. No obstante, los ensayos de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a litio de *ygr122wΔ*, por sobreexpresión del cDNA de PalC, o bien del fenotipo de mimesis de acidez de una estirpe *A.nidulans* con la mutación de pérdida de función *palC185*, por sobreexpresión de *YGR122w*, dieron resultados negativos. Sin embargo, al analizar estos resultados, hay que tener en cuenta que la ruta *RIM* no media la activación heteróloga de PacC en *S. cerevisiae*¹⁵¹, por lo tanto no es del todo inesperado que no exista complementación cruzada entre *YGR122w* y *palC*. Con posterioridad a este trabajo¹³⁷, se ha confirmado que el gen *YGR122w* de *Y. lipolytica* es el ortólogo de PalC²⁵⁸.

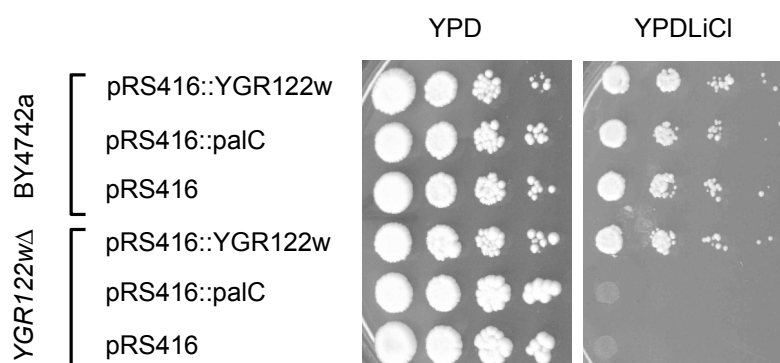


Figura CR.-41: La delección de *YGR122W* provoca un fenotipo de hipersensibilidad a litio. Las estirpes de levadura se transformaron con los plásmidos que aparecen indicados. Diluciones seriadas de cultivos saturados en medio sintético de cada uno los transformantes se inocularon en placas de YPD o YPD con 200 mM de LiCl. El fenotipo de hipersensibilidad a litio se complementa con el plásmido que expresa *YGR122w* pero no con el que expresa *PalC*.

Capítulo II

4. RESULTADOS – Capítulo II

4.8 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalA

PalA es una de las dos de las proteínas de la ruta de pH con dominio Bro1¹⁰⁰ y, al igual que PalC, se une directamente a Vps32 (Resultados; Capítulo I, apartado 4.5.3), por lo que el papel que juega PalA en la ruta de pH podría estar estrechamente relacionado con el de PalC, ya que tienen el mismo interactante. Para estudiar dicho papel se analizó su localización subcelular usando la proteína de fusión PalA::GFP. Para asegurar que PalA::GFP se expresa a niveles fisiológicos, y que su síntesis se regula de manera análoga a la de PalA, la estirpe que expresa PalA::GFP se generó por reemplazamiento génico. En pruebas de cultivo diagnósticas del funcionamiento de la ruta de pH, la estirpe que expresa PalA::GFP mostró un fenotipo indistinguible del de una estirpe silvestre (Figura CR.-42 A), lo que indica que el etiquetado de PalA en el extremo C-terminal no afecta a la función de la proteína. El análisis por western-blot de extractos proteicos de esta estirpe reveló que la proteína de fusión tenía el tamaño esperado (*vide infra*).

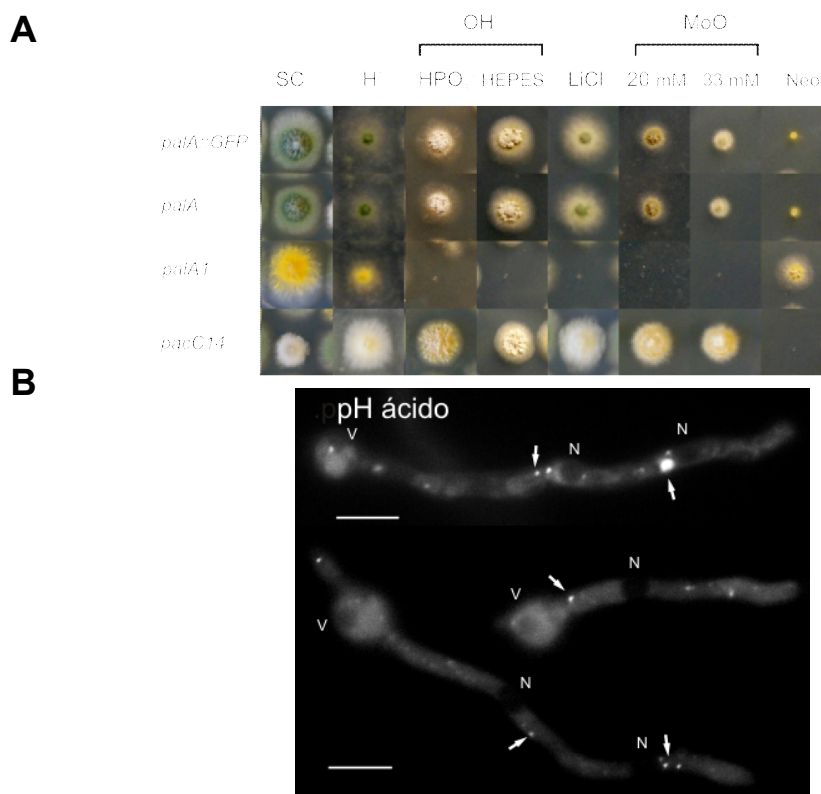


Figura CR.-42: A) PalA::GFP es una proteína funcional. Test fenotípicos en medio sólido en el que se compara la estirpe con el reemplazamiento de *palA* por *palA::GFP* con una estirpe silvestre (*palA*⁺), una estirpe *palA1*, que tiene un fenotipo de mimesis de acidez, y una estirpe *pacC14*, que tiene un fenotipo de mimesis de alcalinidad. Las placas contienen MMA con glucosa al 1% como fuente de carbono, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada cepa. SC: medio sintético completo; H⁺: placas con 500 mM NaH₂PO₄ (pH~5); HPO₄²⁻: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8); HEPES: placas con 100 mM HEPES ajustado a pH 8,4 con NaOH; LiCl: placas con 300 mM de LiCl; MoO₄²⁻: placas con molibdato de sodio a las concentraciones que aparecen indicadas en la figura; Neo: placas con 2mg/ml de sulfato de neomicina. B) Localización subcelular de PalA::GFP. PalA::GFP se localiza en el citoplasma y en puntos distribuidos a lo largo de toda la hifa (en la imagen se señalan algunas de estas estructuras con flechas). En la imagen se señalan las regiones correspondientes a los núcleos (N) y a las vacuolas (V). Las barras representan 5 μm.

Mediante microscopía de fluorescencia, se observó que PalA::GFP se localiza en el citoplasma y en puntos distribuidos a lo largo de toda la hifa ($0,08 \pm 0,03$ puntos/ μm , $n = 20$) (Figura CR.-42 B, flechas). La fluorescencia de PalA::GFP en el citoplasma no era uniforme, y se apreciaba claramente que estaba excluida de determinadas regiones, que se corresponden con vacuolas de gran tamaño o con núcleos (Figura CR.-42 B, indicado en la figura como V y N, respectivamente). El uso de la técnica “time lapse” con el microscopio de fluorescencia demostró la existencia de dos tipos de puntos, unos relativamente estáticos y otros dinámicos. Estos últimos, tras un lapso de tiempo en el cual permanecían inmóviles, desaparecían del plano focal. No obstante, el nivel de fluorescencia de las estirpes que expresan PalA::GFP bajo el control del promotor de *palA* es relativamente bajo, lo que dificultaba el estudio de la dinámica de los puntos en los que se localiza la proteína, debido al tiempo de exposición largo que implica la baja fluorescencia. Por ello, se decidió expresar las proteínas PalA::GFP y PalA::mCherry desde un transgén bajo el control de *alcA*. La sobreexpresión de estas proteínas no da lugar a ningún fenotipo en los tests en placa diagnósticos de la ruta de pH (Figura CR.-43). La observación mediante el microscopio de fluorescencia reveló que, tanto en condiciones de inducción (etanol 1% v/v como única fuente de carbono), como de no inducción y no represión (fructosa 0,1% w/v como única fuente de carbono), la localización de PalA::GFP y PalA::mCherry es similar.

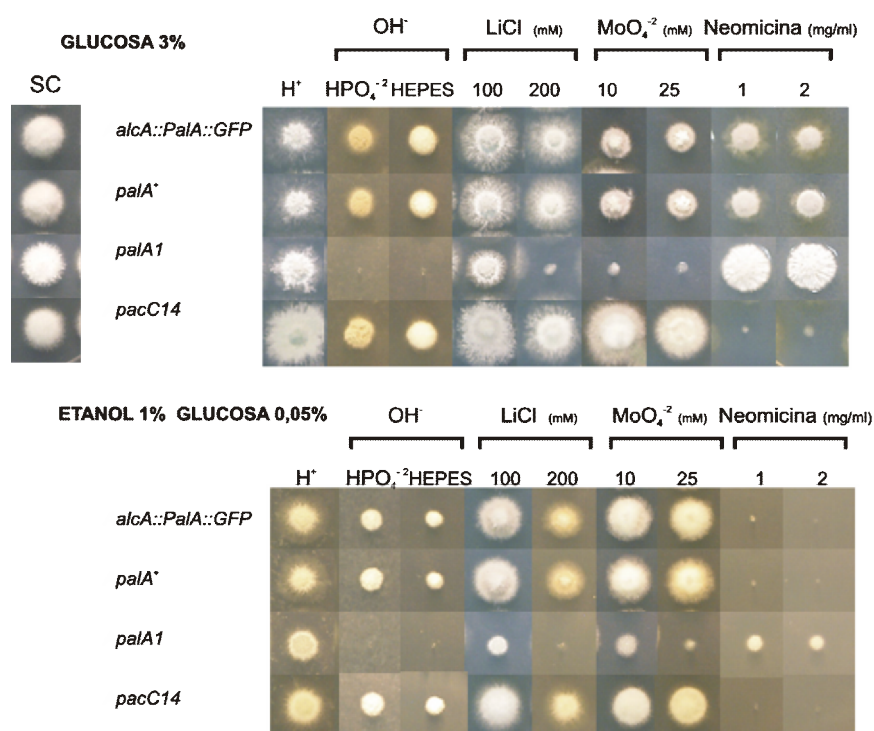


Figura CR.-43. La sobreexpresión de PalA::GFP no da lugar a un fenotipo de regulación por pH. Test fenotípicos en medio sólido en los que se compara, en condiciones de represión (glucosa 3%) y de inducción (etanol 1%, glucosa 0,05%) la estirpe que expresa *palA::GFP* desde un transgén bajo el control del promotor *alcA* con una estirpe silvestre, una estirpe *palA1* (fenotipo de mimesis de acidez) y una estirpe *pacC14* (fenotipo de mimesis de alcalinidad). Las placas contienen MMA con la fuente de carbono que aparece indicada en la figura, 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías de cada cepa. SC: medio sintético completo; H⁺: placas con 500 mM NaH₂PO₄ (pH~5); HPO₄²⁻: placas con 200 mM Na₂HPO₄ (pH~8); HEPES: placas con 100 mM HEPES ajustado a pH 8,4 con NaOH. Las concentraciones de LiCl, molibdato de sodio (MoO₄²⁻) y neomicina aparecen indicadas en la figura.

En estas estirpes se observa claramente una fluorescencia citoplásmica, que está ausente en ciertas regiones de la hifa, que por su morfología, se corresponden con los núcleos (Figura CR.-44 A, indicado en la figura como N). Al igual que ocurría en la estirpe con el reemplazamiento génico, PalA::GFP se localiza en estructuras punteadas (Figura CR.-44 B y C). En este caso, el aumento de la intensidad de fluorescencia, debido a la sobreexpresión, permitió caracterizar la dinámica de los puntos de PalA::GFP, y se comprobó que, efectivamente, existían dos tipos: los puntos con mayor intensidad de fluorescencia eran estáticos o se movían a corta distancia (Figura CR.-44 B, flecha); un segundo tipo incluía puntos generalmente móviles, que apenas se diferenciaban del fondo citoplásmico (Figura CR.-44, flecha negra), y que deben corresponderse con endosomas tempranos (véase Resultados, Capítulo I, apartado 4.5).

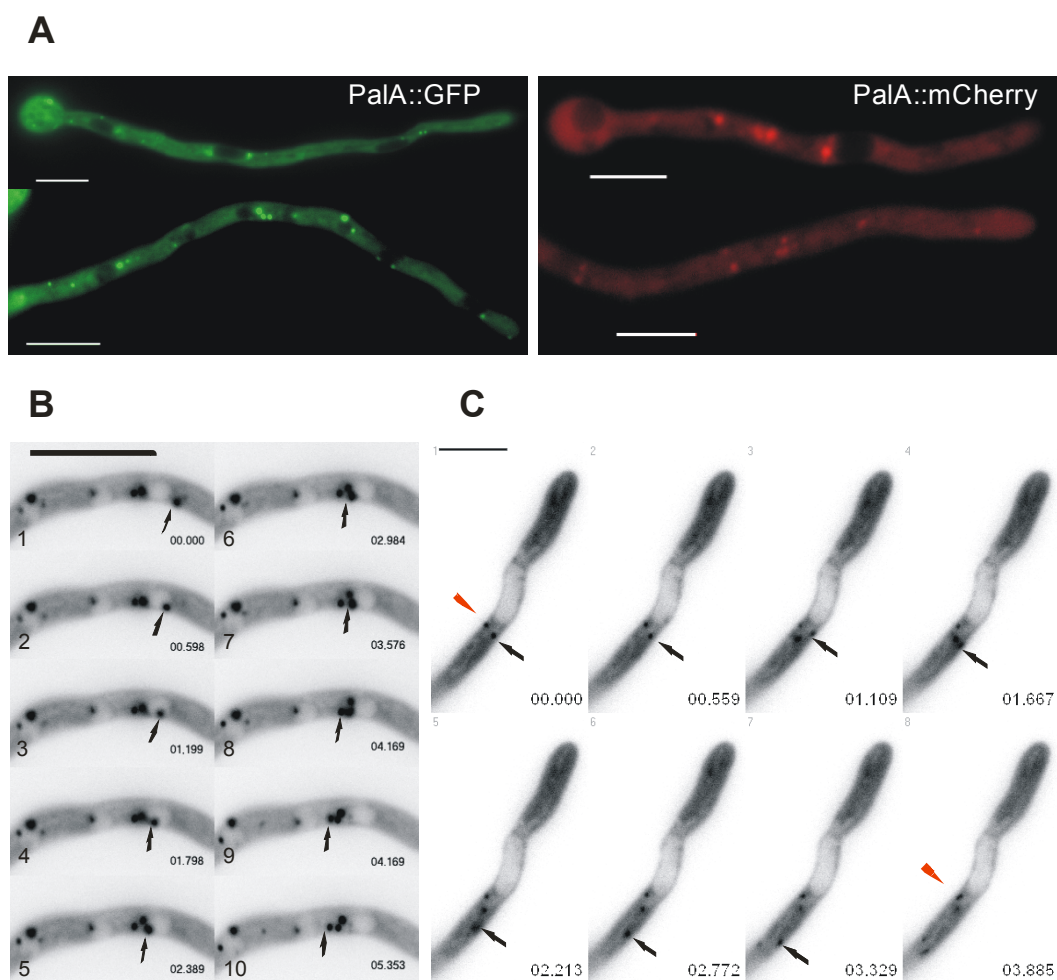


Figura CR.-42. Localización subcelular de PalA::GFP y PalA::mCherry expresadas bajo el control del promotor *alcA*.

A) Células de las estirpes que expresan PalA::GFP y PalA::mCherry desde transgenes bajo el promotor de *alcA*, cultivadas en condiciones de inducción (etanol 1% v/v como única fuente de carbono) a pH ácido. En la imagen se señalan las regiones correspondientes a los núcleos (N). B) Localización de PalA::GFP en puntos móviles o estáticos intensamente fluorescentes en una cepa *alcA^P::palA::GFP* cultivada en etanol al 1% como única fuente de carbono. La flecha negra señala un punto que se mueve hacia otros dos relativamente estáticos y próximos. El tiempo transcurrido entre cada imagen se indica como sec::msec. C) Localización de PalA::GFP en puntos estáticos o móviles con baja intensidad de fluorescencia (nótese el contraste con el fondo de la hifa en comparación con las imágenes del apartado B) en una cepa *alcA^P::palA::GFP* cultivada en etanol al 1% como única fuente de carbono. En la imagen se observa un punto, que tras un lapso de tiempo en el que permanece inmóvil, empieza a moverse. Como referencia se indica un punto que permanece estático (flecha roja). El tiempo transcurrido entre cada imagen se indica como sec::msec. Las barras representan en todos los casos 5 μ m.

Ocasionalmente, se observaron puntos de gran tamaño y altamente fluorescentes, tanto en la estirpe que expresa la proteína PalA::GFP bajo el promotor de *palA*, como en la que la expresa bajo *alcA*, (Figura CR.-42 B). Posiblemente se trata de regiones donde existen varios puntos estáticos muy próximos, y que no pueden resolverse en nuestro microscopio, cuyo límite de resolución es de 0,23µm.

Por tanto, estos resultados demuestran que PalA se localiza en el citoplasma y en estructuras punteadas que se diferencian en cuanto a su nivel de fluorescencia y su motilidad. Al contrario de lo que sucede con PalC, la localización de PalA sí se corresponde con una localización en endosomas, lo que estaría de acuerdo con la interacción descrita entre PalA y Vps32. Teniendo en cuenta la localización de Vps32 (véase Resultados; Capítulo I, apartado 4.5.3), es muy posible que las estructuras de mayor tamaño y estáticas que marca PalA::GFP sean endosomas tardíos que contienen a Vps32, mientras que las estructuras móviles serían endosomas tempranos, en los que también se ha demostrado que se localiza Vps32 (Resultados; Capítulo I; apartado 4.5.3). Hay que señalar que el análisis de la localización de PalA, mediante el microscopio de fluorescencia se llevó a cabo en condiciones “estándar”, en donde el pH del medio de cultivo era 5,2; condiciones en las cuales la ruta *pal* no se activa y no se procesa PacC⁷².

4.8.1 LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA *pal* NO CAUSA MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EVIDENTES O INCREMENTO EN LA SÍNTESIS DE PalA.

En el análisis por western-blot de la estirpe que expresa PalA::GFP bajo el promotor de *palA* se observó que, en extractos proteicos preparados de acuerdo al protocolo estándar, PalA::GFP se degrada rápidamente, lo que, unido a su bajo nivel de expresión, hacía que apenas se detectase la proteína intacta. La inestabilidad de PalA::GFP dificulta el estudio, por western-blot, de un posible cambio en los niveles de expresión y/o en la estabilidad de la proteína dependientes del pH ambiental. No obstante, se establecieron condiciones de extracción que permitían llevar a cabo ensayos de cambio de pH para estudiar si la activación de la ruta *pal* provoca una modificación post-traduccional detectable por un cambio en la movilidad electroforética. Dichos ensayos se realizaron con las estirpes generadas por reemplazamiento génico que expresaban PalA::GFP y PalC::GFP, en condiciones en las que se detectaba, por western blot, la proteína PalA::GFP intacta en extractos proteicos de micelio cultivado a pH ácido. El uso de la proteína PalC::GFP como control permitiría comparar los niveles de proteína de PalA con los de PalC.

La detección mediante western-blot de PalA::GFP en los ensayos de pH demostró que los niveles de la proteína permanecen más o menos constantes tras 30 minutos del cambio de pH, aunque se observaron bandas de degradación, cuya prominencia aumentó conforme aumentó el tiempo de incubación de las células a pH alcalino (Figura CR.-45). No obstante, suponemos que dichas bandas no tienen ningún significado funcional, sino que, probablemente, reflejan una degradación debida al estrés del cambio de pH, facilitada, posiblemente, por la unión de PalA a Vps32, que está implicada en la formación de los MVBs, por lo que es altamente probable que una fracción de PalA::GFP acabe degradándose en la vacuola. En la banda correspondiente a la proteína intacta no se observó un cambio evidente de la movilidad electroforética. Por tanto, la función de PalA en la ruta de pH debe

depender de cambios en su localización subcelular y/o de su interacción con otras proteínas (i.e. Vps32 y PacC⁷²) en función del pH ambiental.

Por otra parte, hay que señalar que los niveles de proteína que se detectan de PalA::GFP son más bajos que los de PalC::GFP (Figura CR.-45). Al estar marcadas con el mismo epítipo, la detección de PalA::GFP y PalC::GFP mediante western blot permite comparar la cantidad de ambas proteínas en función de la intensidad de la banda obtenida en el blot. En la figura CR.-45 se muestra cómo para detectar, en los análisis de western blot, cantidades similares de PalA::GFP (carril 1, arriba) y PalC::GFP (carril 7, panel superior) es necesario cargar cuatro veces más de proteína total de los extractos de PalA::GFP que de los de PalC::GFP (compárese el control de carga con el anticuerpo α -actina en los carriles 1 y 7, panel inferior). Lo que indicaría que el nivel de expresión de PalA es menor que el de PalC, aunque no se puede descartar que, en la condiciones empleadas para preparar los extractos proteicos, se obtenga más cantidad de PalC::GFP que de PalA::GFP.

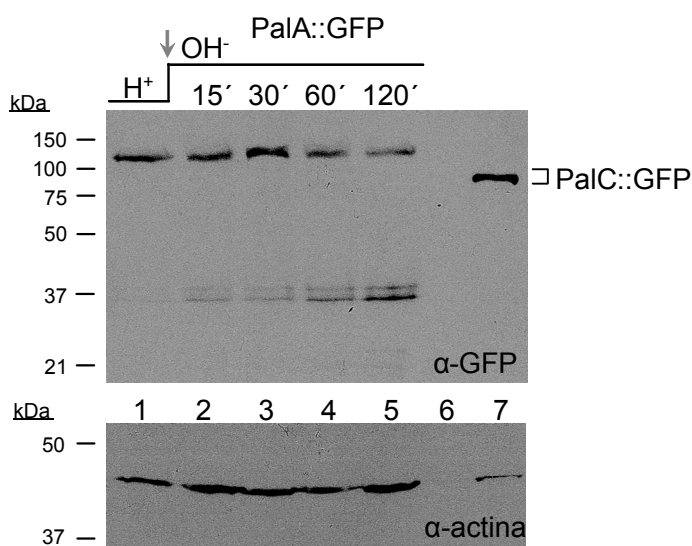


Figura CR.-45: PalA no sufre ninguna modificación post-traduccion detectable por SDS-PAGE. Análisis por western-blot de una estirpe *palA::GFP*. Células de esta estirpe cultivadas en condiciones ácidas (H⁺: pH 4,5) se transfirieron a condiciones alcalinas (OH⁻: pH 8,4). Las muestras tomadas en los tiempos que aparecen indicados se analizaron con anticuerpos α -GFP (arriba) para detectar tanto PalA::GFP como PalC::GFP y con α -actina (abajo), como control de carga.

4.8.2 CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalA EN FUNCIÓN DEL PH AMBIENTAL

En *S. cerevisiae*, el ortólogo de PalA, Rim20p se recluta a los endosomas de manera dependiente de Vps32p y de pH alcalino¹⁸¹. Sin embargo, cuando se observó la localización de PalA::GFP a pH ácido (véase Resultados, Capítulo II, apartado 4.8.2) se demostró que, esta proteína se localiza en el citoplasma y en estructuras punteadas que podrían corresponde con endosomas “tempranos” y “tardíos” en los que se localiza Vps32. Por ello, estudiamos si la localización de PalA, cambia dependiendo del pH ambiental: se observó, mediante microscopía de fluorescencia, el comportamiento de la estirpe que expresa PalA::GFP a niveles fisiológicos, en experimentos de cambio de pH similares a los que se habían realizado para estudiar la localización de PalC::GFP.

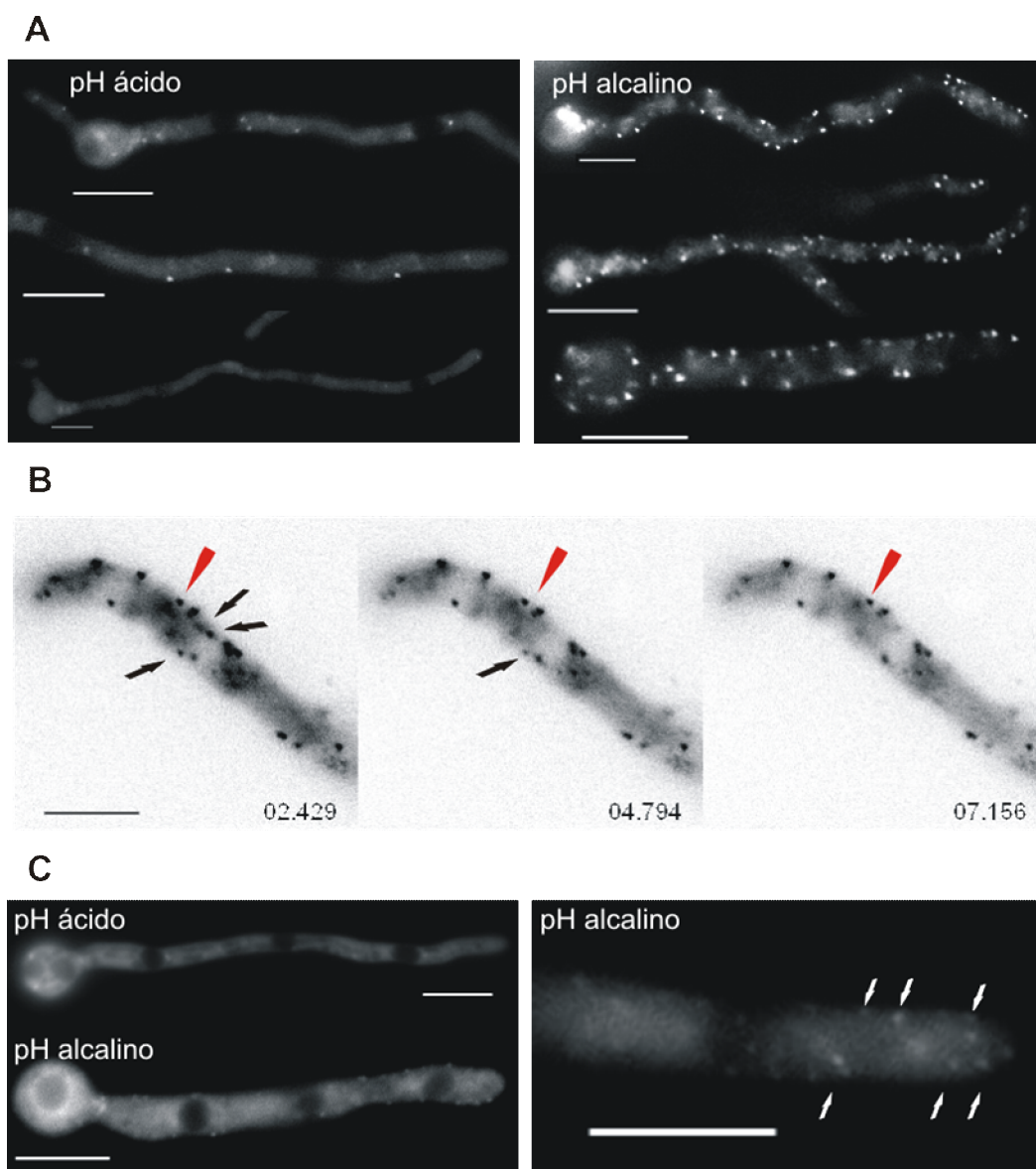


Figura CR.-46: La localización de PalA es dependiente de pH. A) Células de una estirpe que expresa PalA::GFP a niveles fisiológicos se cultivaron a pH ácido y se transfirieron a pH ácido (pH 5,2) y alcalino (pH 8,2), 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. B) Imágenes de una hifa transferida a pH alcalino. La mayoría de los puntos aparecen en las tres imágenes secuenciales (i.e. flecha roja), lo que indica que son estáticos y que la localización de PalA a estas estructuras tiene una vida media superior al tiempo de observación. Debido al elevado tiempo de exposición necesario para tomar cada imagen, no se puede determinar si existen puntos móviles. No obstante, las flechas negras señalan puntos que no aparecen en las tres imágenes (flechas negras) y que podrían ser móviles. El tiempo transcurrido entre cada imagen se indica como sec.:milisec. C) Germínulas de la estirpe que expresa PalA::GFP bajo el promotor de *alcA* cultivadas en condiciones de inducción (1% etanol como fuente de carbono) se transfirieron a condiciones de represión (1% glucosa w/v) a pH ácido (pH 5,2) y alcalino (pH 8,2), 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. A pH alcalino se observan puntos corticales. En la imagen de la derecha las flechas señalan los puntos en los que se localiza PalA::GFP como consecuencia del cambio de pH de ácido a alcalino. Su intensidad de fluorescencia hace que apenas se distingan del fondo citoplásmico. La barra representa en todos los casos 5 μ m

El cambio a pH alcalino provoca un aumento muy marcado (~10 veces) del número de estructuras punteadas en las que se localiza PalA::GFP ($0,11 \pm 0,03$ puntos/ μm , $n=20$, a pH=5 y $1,25 \pm 0,45$ puntos/ μm , $n=20$, a pH=7). Dichas estructuras predominan en la región cortical de las hifas (Figura CR.-46 A). La característica más notable de estas estructuras punteadas que aparecen en respuesta a la alcalinización del medio es que son estáticas. En la figura CR.-46 B se observa la región apical de una célula tras un cambio a pH alcalino. El aumento en el número de puntos es evidente, y aunque el tiempo de exposición necesario para obtener cada imagen es relativamente largo, debido a la baja intensidad de fluorescencia, e impidió observar diferencias entre puntos móviles y estáticos, sí se observa en la figura CR.-46 B que existen puntos que desaparecen entre las distintas imágenes (flechas negras), mientras que la mayoría permanecen a lo largo de la observación (flecha roja). Los puntos que desaparecen entre unos fotogramas y otros pueden representar puntos móviles o bien puntos estáticos que tienen una determinada vida media y, al cabo de cierto tiempo, desaparecen. La respuesta de PalA al pH alcalino es, al igual que la de PalC, muy rápida. El tiempo que se emplea, tras el cambio de pH, en montar las preparaciones para su observación es suficiente para que se observe un notable incremento en el número de puntos estáticos en los que se localiza PalA::GFP.

También se analizó la respuesta de PalA al cambio de pH en células con el transgén. *alcA^P::PalA::GFP*. Sin embargo, el elevado nivel de fluorescencia citoplásmico apenas permitió observar los puntos que aparecen debido al cambio a pH alcalino (Figura CR.- 46 C), dado que el fondo citoplásmico fue demasiado elevado en este caso. También, hay que tener en cuenta que esta células tienen una copia de PalA endógena, que podría competir con PalA::GFP, lo que limitaría el reclutamiento de PalA::GFP a los puntos estáticos dependiente del cambio de pH.

Estos datos indican que PalA comparte con PalC no sólo la capacidad de unirse a Vps32, sino también la de localizarse en estructuras estáticas, mayoritariamente corticales, de manera dependiente de pH. Se diferencian, sin embargo, en la localización a pH ácido, donde PalC se localiza de manera uniforme en el citoplasma y ocasionalmente en alguna estructura cortical, mientras que PalA se localiza en el citoplasma, excluida de los núcleos, y en estructuras punteadas estáticas y móviles. La presencia de PalA en dichas estructuras podría ser dependiente de Vps32. Como se ha señalado anteriormente, las características de estas estructuras punteadas coinciden con los endosomas “tempranos” (estructuras móviles) y “tardíos” (estructuras estáticas) en los que localiza Vps32. Esto indica que PalA estaría asociada a Vps32 a pH ácido, cuando la ruta de pH no está activa.

4.8.3 LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalA EN ESTRUCTURAS CORTICALES DEPENDE DEL RECEPTOR DE 7-TMD PalH, PERO NO DE PalB.

La alcalinización del pH provoca un cambio en la localización de PalA::GFP. Si, al igual que ocurre con la localización de PalC, dicho cambio estuviese implicado en el funcionamiento de la ruta de transducción de señal, debiera de producirse como resultado de la activación de ésta. Por ello, se comprobó si el cambio en la localización de PalA necesita del receptor de 7-TMD, PalH. Si el aumento de los puntos dependiese no sólo de

pH, sino de los componentes de la ruta *pal* situados aguas arriba de PalA, deberíamos concluir que el reclutamiento de PalA a dichos puntos refleja, de alguna manera, su función fisiológica.

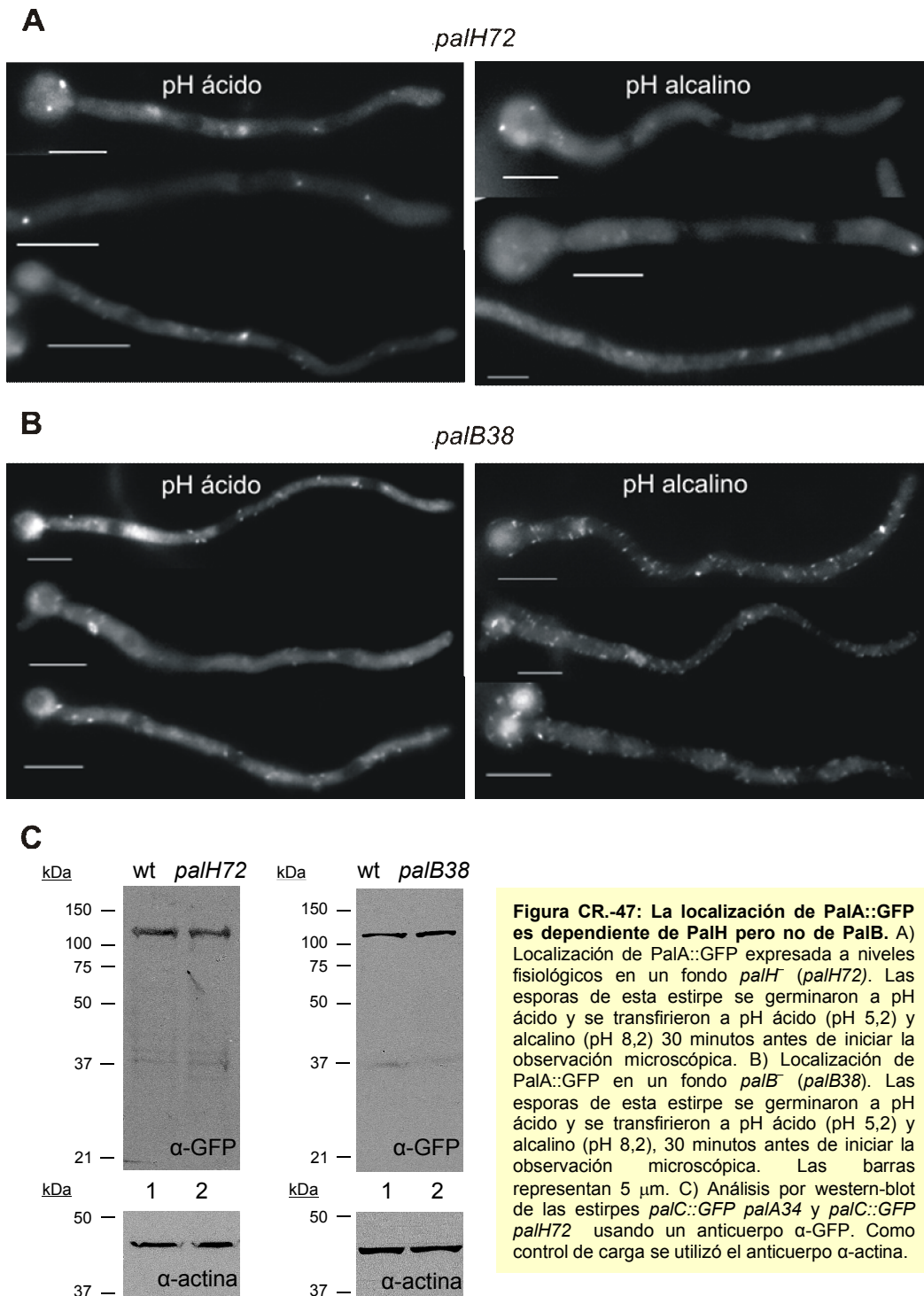


Figura CR.-47: La localización de PalA::GFP es dependiente de PalH pero no de PalB. A) Localización de PalA::GFP expresada a niveles fisiológicos en un fondo *palH*⁻ (*palH72*). Las esporas de esta estirpe se germinaron a pH ácido y se transfirieron a pH ácido (pH 5,2) y alcalino (pH 8,2) 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. B) Localización de PalA::GFP en un fondo *palB*⁻ (*palB38*). Las esporas de esta estirpe se germinaron a pH ácido y se transfirieron a pH ácido (pH 5,2) y alcalino (pH 8,2), 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. Las barras representan 5 μm. C) Análisis por western-blot de las estirpes *palC*::GFP *palA34* y *palC*::GFP *palH72* usando un anticuerpo α-GFP. Como control de carga se utilizó el anticuerpo α-actina.

Se obtuvieron, mediante recombinación meiótica, estirpes con el alelo nulo *palH72*, que expresan PalA::GFP bajo su propio promotor. El genotipo de estas estirpes se confirmó por secuenciación directa del alelo mutante y se demostró, mediante western-blot, que PalA::GFP se expresa al mismo nivel en un fondo genético *palH72* que en un fondo *palH⁺* (Figura CR.-47 C). Se analizó la localización de PalA::GFP en estirpes *palH⁺* y *palH72*, descendientes del mismo cruce. Tanto en las estirpes *palH⁺* como *palH72*, a pH ácido, la fluorescencia se localiza casi exclusivamente en el citosol. Ahora bien, cuando se alcalinizó el pH del medio, en la cepa *palH72* no se observó el aumento de los puntos corticales estáticos en los que, en la estirpe *palH⁺*, se localiza PalA::GFP (Figura CR.-47 A).

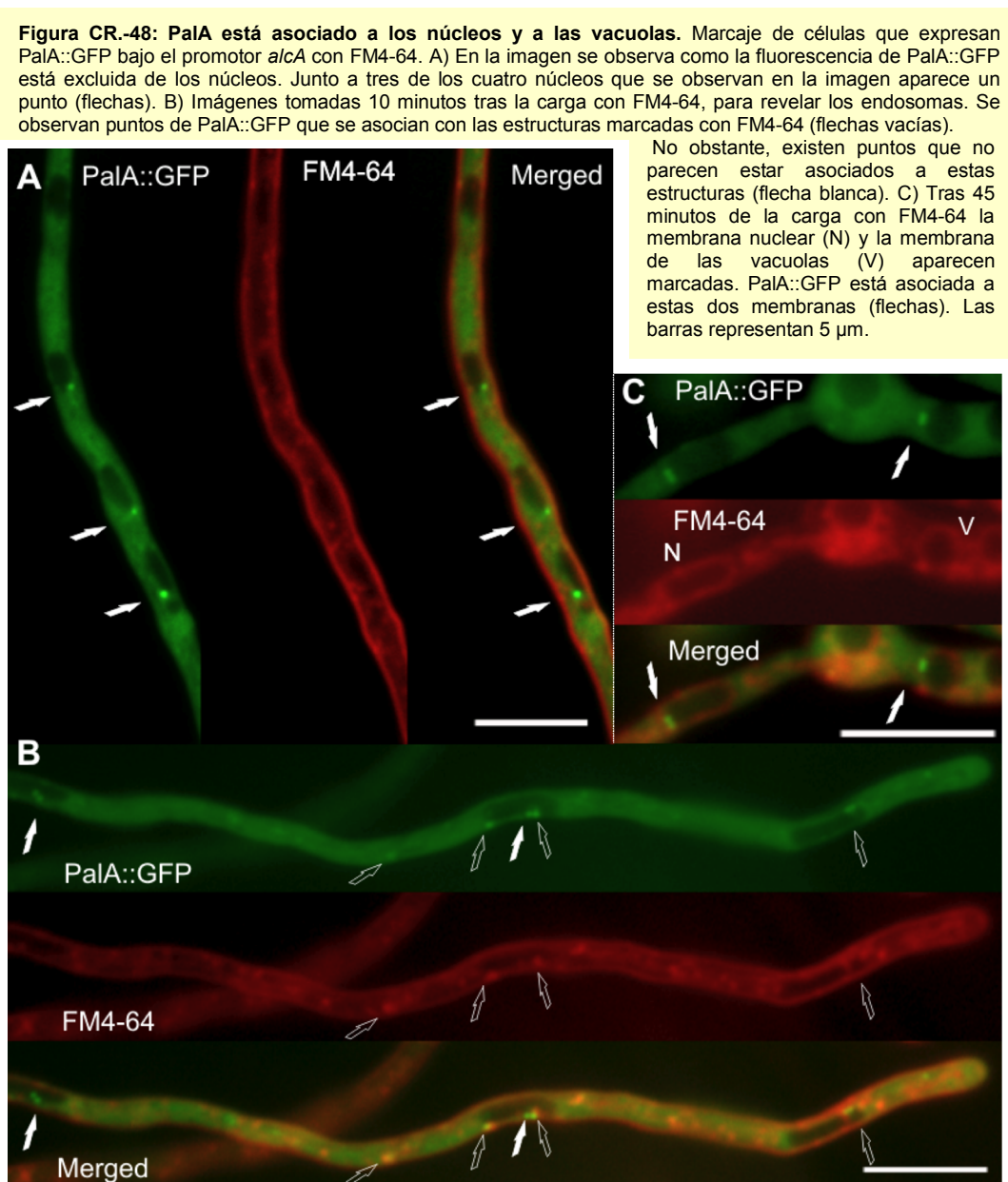
De la misma forma, se estudió si la localización de PalA::GFP se veía afectada en un fondo genético *palB38*, (este alelo mutante trunca la proteína PalB de 847 residuos en el residuo 54, por lo que se puede considerar como un alelo nulo). La localización de PalA::GFP en un mutante *palB38* es indistinguible de la de una cepa *palB⁺*, tanto a pH ácido como a pH alcalino (Figura CR.-47 B). El hecho de que PalA se relocalice en puntos, de manera dependiente de pH y del receptor de 7-TMD, PalH, pero que su localización no dependa de PalB, indica, por un lado, que el cambio en la localización es consecuencia de la función fisiológica de PalA y, por otro, que el papel de PalA en la ruta de transducción de señal está por encima o al mismo nivel que PalB, como cabría esperar dado que PalB es la proteína candidata a ser la “proteasa señalizadora”.

4.8.4 PalA ESTÁ ASOCIADO A LOS ENDOSOMAS TARDÍOS, LOS NÚCLEOS Y A LAS VACUOLAS.

El aumento de la intensidad de fluorescencia al expresar PalA::GFP bajo el control del promotor *alcA* permitió observar que, generalmente asociados o en la proximidad de los núcleos, aparece al menos uno de los puntos estáticos (Figura CR.- 48 A). Resulta difícil determinar si esta característica se debe a la sobreexpresión de PalA::GFP, ya que, aunque se carece de evidencia estadística, en el estudio de la localización de PalA::GFP bajo el promotor de *pala* se habían observado células con puntos asociados a los núcleos (Figura CR.- 42 B).

El marcaje con FM4-64 de germinulas que expresan PalA::GFP bajo el control *alcA^p* reveló que estos puntos estáticos no están asociados a la membrana plasmática ni a los puntos corticales que se marcan con el fluoróforo lipofílico tras 5 minutos de su carga (Figura CR.-48 A). En cambio, están asociados con los endosomas que se marcan con FM4-64 a los 10-15 minutos de su internalización. En la figura CR.-46 B se muestran ejemplos de estructuras que contienen PalA::GFP que colocalizan con FM4-64 (flechas vacías). Dichas estructuras son relativamente estáticas, al contrario que los endosomas tempranos, que son móviles, lo que indica que se trata, probablemente, de endosomas tardíos. Las condiciones en las que se realizó el experimento (25°C y con la captura de las imágenes de manera secuencial: primero la captura de la imagen en el canal rojo para el FM4-64, y posteriormente en el canal verde para PalA::GFP) no permitirían que, de haber estado asociado PalA::GFP a los endosomas tempranos, colocalizase con éstos, dado el lapso de tiempo que transcurre entre la captura de las distintas imágenes, durante el cual los endosomas tempranos habrían cambiado de localización. No obstante, en la misma figura CR.-48 B se observan estructuras con PalA::GFP que no tiñen con FM4-64 tras 10 o

15 minutos de la carga, que se encuentran en la región perinuclear (flechas blancas), y que parecen estar asociados a la membrana nuclear (Figura CR.-48). De hecho, en las imágenes tomadas a 45 minutos tras la carga con FM4-64, un tiempo al que el fluoróforo marca la membrana nuclear y la membrana de la vacuola, se observan puntos de PalA::GFP asociados con ambas membranas [Figura CR.-48 C indicados en la imagen como N (núcleo) y V (vacuola)].



En resumen, el marcaje de las estructuras a las que PalA::GFP se localiza a pH ácido con FM4-64 permitió clasificarlos de acuerdo a su localización: a) puntos asociados a la membrana nuclear, b) puntos asociados a la membrana de la vacuola y c) puntos que colocalizan con endosomas tardíos. Vps32 se localiza

también en la vacuola y en endosomas tardíos (Resultados, Capítulo I, apartado 4.5.3), de acuerdo con la interacción física de PalA con Vps32. Sin embargo, desconocemos si la localización a pH ácido de PalA en estas estructuras juega algún papel en la transducción de la señal de pH, ya que, como hemos descrito anteriormente, los puntos a los que PalA es reclutada, cuando se produce la alcalinización del medio, son preferentemente corticales, y no se corresponden con las estructuras de PalA::GFP asociadas con las vacuolas o con los endosomas tardíos, que se caracterizan por tener una mayor intensidad de fluorescencia.

4.8.5 PalA ESTÁ ASOCIADO AL “SPINDLE POLE BODY”, EL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS EN HONGOS

La asociación de PalA::GFP a la membrana nuclear y la presencia de puntos estáticos, prácticamente en todos los núcleos de la célula, sugirió que PalA podría estar asociado a los “spindle pole body” (SPB), centros organizadores del microtúbulos equivalentes al centrosoma de mamíferos, que están anclados a la membrana nuclear (revisado en Jaspersen et al. ²⁵⁹). La estructura al microscopio electrónico de los SPB demuestra que están formados por tres discos, o capas, más electrodensas: a) una placa externa que está en contacto con el citoplasma, b) otra placa interna en contacto con el nucleoplasma y c) una placa central que atraviesa la membrana nuclear. Uno de los primeros eventos que tiene lugar en la división nuclear es la duplicación del SPB, la cual ocurre durante la fase S del período de interfase ²¹⁸. Los SPB permanecen juntos hasta el final de la fase G2 y el comienzo de la mitosis. Cuando el núcleo entra en mitosis se empiezan a nucleolar microtúbulos en la placa interna de los SPBs (revisado en Doonan et al. ²⁶⁰). Mientras estos microtúbulos intranucleares crecen, los SPBs se desplazan hacia posiciones opuestas en la membrana nuclear, la cual, al contrario de lo que sucede en mamíferos, no desaparece durante la mitosis ²¹⁸. En metafase los SPBs están situados en polos opuestos del núcleo. Los microtúbulos nucleados en la placa interna de cada uno de los SPBs se disponen con su extremo “+” hacia el polo opuesto, formando un haz de microtúbulos, cuyos extremos + se entrecruzan y se asocian con el cinetocoro de los cromosomas. Este haz de microtúbulos se elonga durante la anafase, mientras el número de microtúbulos astrales asociados a la placa externa de los SPBs aumenta. Al final de la mitosis se produce la cariocinesis y los dos núcleos hijos heredan en su membrana uno de los SPBs (revisado en Doonan et al ²⁶⁰).

En interfase PalA está excluido de los núcleos y se localiza en puntos asociados a la membrana nuclear que podrían corresponderse con los SPBs (Figura CR.-49), dado que se duplican justo antes de detectarse una entrada masiva de PalA en el núcleo (Figura CR.-49 A, imagen 3). Una de las características de la mitosis en *A. nidulans* es que no se trata de una mitosis completamente cerrada, como en el caso de *S. cerevisiae*, sino que existe un desensamblaje parcial del poro nuclear ²¹⁹. La entrada de PalA al núcleo parece coincidir con el desensamblaje de los poros nucleares, aunque, dado el aumento de fluorescencia que se observa con respecto al fondo citoplásmico, probablemente su entrada se acompañe de su retención en el interior del núcleo debido a su asociación (directa o indirecta) con la cromatina en división o al huso mitótico.

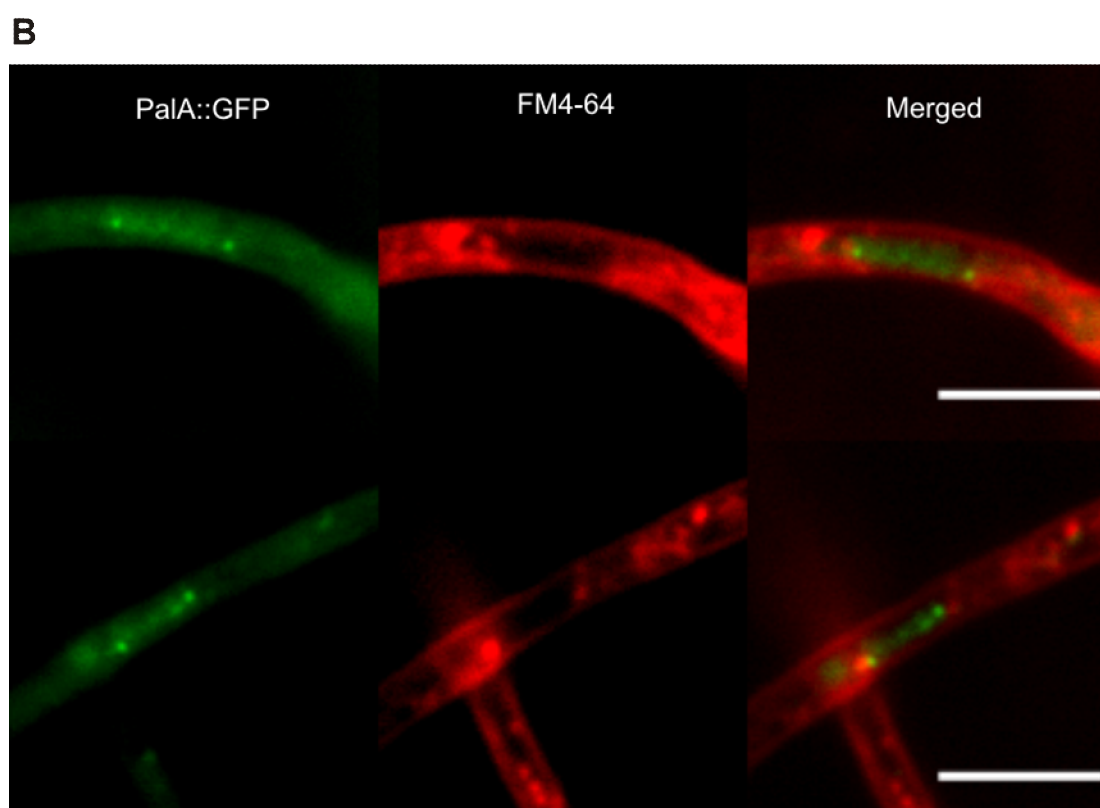
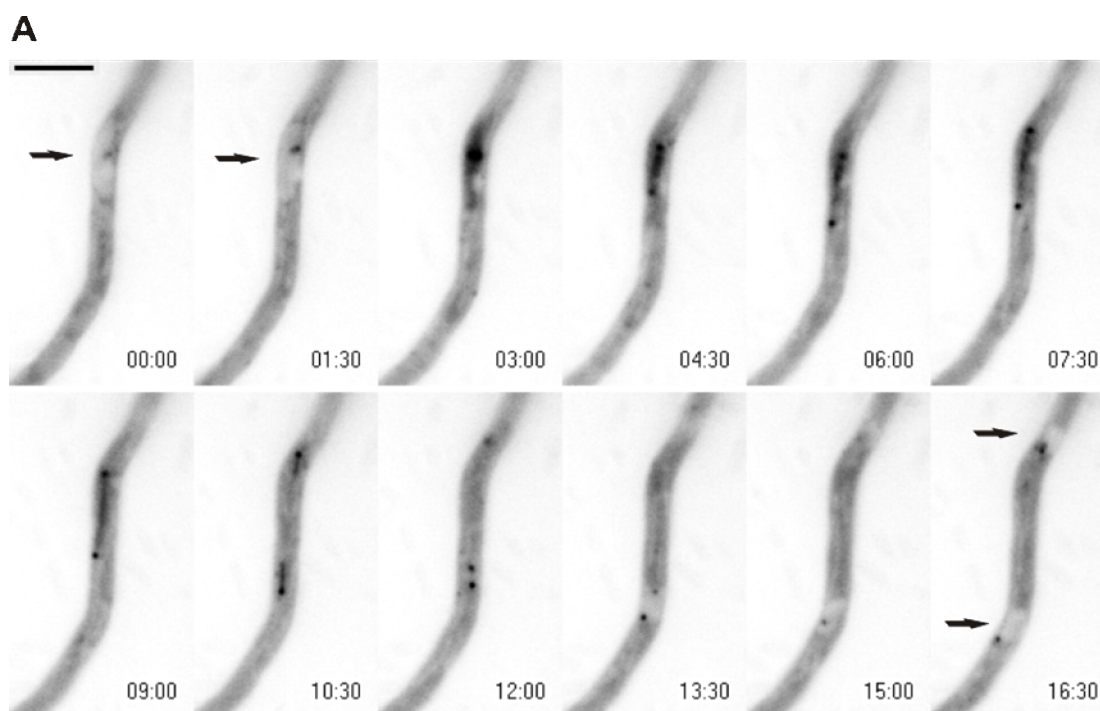


Figura CR.-47: PalA parece asociarse a los “spindle pole bodies” A) Secuencia de imágenes de una célula que expresa PalA::GFP bajo el promotor *alcA*. Las flechas negras señalan las estructuras asociadas a los núcleos. En las dos primeras imágenes aparece un núcleo con el punto característico de PalA::GFP asociado; posteriormente se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia en el interior del núcleo y la aparición de una estructura filamentosa que une dos puntos. Al final de la secuencia los puntos se separan y aparecen de nuevo regiones con una menor intensidad de fluorescencia, que se corresponden con los núcleos. El tiempo transcurrido entre cada imagen se indica como min::sec. B) En células cargadas con FM4-64, la estructura filamentosa en la que se localiza PalA::GFP se encuentra en una región que no se marca con FM4-64. Las barras representan 5 μ m.

En el interior del núcleo o asociado a la membrana nuclear, PalA se relocaliza en una estructura filamentosa flanqueada por los dos puntos que parecen corresponderse con los SPBs. Esta estructura filamentosa podría representar los microtúbulos que forman el huso mitótico, nucleados en la cara interna de cada uno de los SPBs, o el remanente de membrana nuclear que queda entre los núcleos en división. Dicha estructura se va elongando hasta que se divide y los dos puntos que se marcan con PalA se separan moviéndose en direcciones opuestas (Figura CR.-49 A). Posteriormente, las estructuras filamentosas asociadas a los puntos desaparecen y de nuevo PalA es excluida del interior de los núcleos. Seguramente, esto representa la última fase de la división nuclear en la que se produce la cariocinesis, se restablecen los NPCs y cada SPB queda asociado a la membrana de uno de los dos núcleos hijos (Figura CR.-49 A).

En células cargadas con FM4-64, donde aparece marcada la membrana nuclear, se observa a PalA en el interior del núcleo, aparentemente asociado a esta estructura filamentosa que podría ser el huso mitótico (Figura CR.-49 B). La localización de PalA en el interior de los núcleos durante la mitosis es independiente del pH del medio, ya que se da tanto en condiciones ácidas como alcalinas. Otro de los datos que apoyan que las estructuras a las que se asocia PalA dentro de los núcleos podrían ser los husos mitótico o el remanente de membrana nuclear, es que la entrada de PalA al núcleo es sincrónica, o cuasi-sincrónica, en todos los núcleos de la célula, como sucede con la entrada en mitosis de los núcleos de una célula en *A. nidulans*. En la figura CR.-50, en la hifa situada a la derecha de la imagen, la entrada de PalA en los cuatro núcleos que se observan se produce a la vez, mientras que en la hifa situada a la izquierda de la imagen la entrada de PalA se produce de manera progresiva desde los núcleos más alejado del ápice de la hifa a los que se encuentran más cerca de éste.

La desaparición de PalA del interior de los núcleos al final de la división nuclear, y la localización estrictamente citoplásmica de PalA durante la interfase, parece indicar que PalA es exportado activamente de manera directa o indirecta desde el interior del núcleo al citoplasma.

Es muy improbable que la asociación de PalA con los SPBs y el huso se deba a una función de la proteína durante la mitosis, dado que en mutantes nulos de *palA* (i.e. *palA34*, un alelo mutante que trunca la proteína en el residuo 32 de los 897 que tiene PalA) no se ha observado un fenotipo que relacione la función de PalA con la mitosis y/o la cariocinesis. Aunque el homólogo en humanos de PalA, Alix, está implicado en la citocinesis e interacciona con proteínas del anillo contráctil que se forma alrededor del huso durante la anafase²⁰³⁻²⁰⁵, la ausencia de fenotipo de los mutantes *palA34*, indica que la hipótesis más pausable es que PalA entre al núcleo asociado a otra proteína y que actué como reportero de dicha proteína. Uno de los interactores de PalA es Vps32¹⁰⁰ (este trabajo), de manera que es probable que PalA entre al núcleo asociado Vps32. Sin embargo, sólo podemos especular sobre la función de Vps32 asociado al SPB. Puede ser que esté asociada a las constricciones

RESULTADOS – Capítulo II

de la membrana nuclear que quedan entre los dos núcleos, y que el ESCRT-III esté implicado en la escisión de la membrana nuclear, como sucede con la membrana plasmática durante el proceso de abscisión en mamíferos^{203-205,208}. De ser así, la estructura filamentosa podría representar el remanente de membrana nuclear, que queda entre los núcleos que se están separando. Una alternativa no excluyente es que se asocie a los MTS del huso y medie su separación. En mamíferos el ESCRT-III recluta la espastina una AAA-ATPasa que interactúa fuertemente con los microtúbulos y es esencial para que se complete el proceso de abscisión²⁶¹.

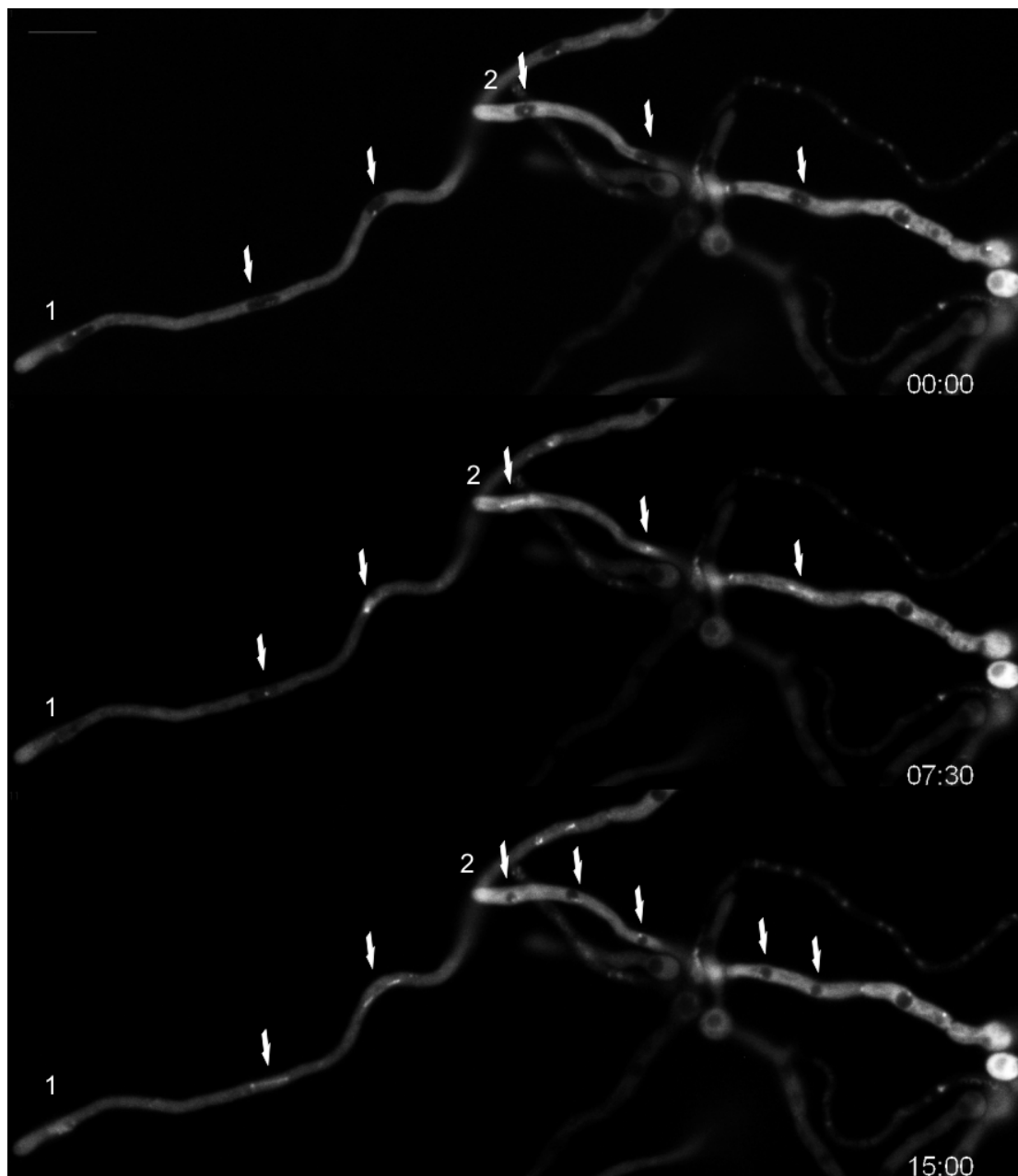


Figura CR.-48: La localización de PalA::GFP en el interior de los núcleos es independiente de pH. En la secuencia de imágenes se observan en primer plano dos hifas (1 y 2) de la estirpe *alcA::palA::GFP*, cultivadas en condiciones de inducción (1% etanol) a pH ácido (pH 5,1) y transferidas a condiciones de represión a pH alcalino (pH 8,2), 30 minutos antes de iniciar la observación microscópica. Los núcleos de cada una de las hifas están señalados con flechas. En la primera de las imágenes se observa la ausencia de fluorescencia en los núcleos. En la segunda de las imágenes se observa la entrada de PalA::GFP en los núcleos (que en la hifa 1 se produce de forma progresiva hacia la punta de la hifa, como corresponde a la progresiva, cuasi-sincrónica entrada en mitosis de los diferentes núcleos). En la última de las imágenes se pueden observar de nuevo los núcleos en negativo en la hifa 2, mientras que en la hifa 1 se observan las estructuras filamentosas que unen los dos SPBs de cada núcleo durante la mitosis. La barra representa 5 μ m

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El factor de transcripción PacC se activa a través de un procesamiento proteolítico en dos pasos ¹⁴⁶. El primer corte proteolítico es dependiente de pH y de la ruta *pal* de transducción de señal. Cuando el pH ambiental es alcalino la proteasa señalizadora, posiblemente PalB, convierte PacC⁷² en PacC⁵³. PalA y PalC forman parte de la ruta *pal*, y la pérdida de función de cualquiera de estas proteínas previene el procesamiento de PacC⁷² a cualquier valor de pH ¹⁴⁶ (este trabajo). El análisis de PalC y PalA demuestra que, los niveles de estas proteínas no cambian y que ninguna de las dos experimenta cambios post-traduccionales evidentes como consecuencia de la alcalinización del medio. Estos resultados sugerirían que tanto el papel de PalC como el de PalA implicaría únicamente cambios en su interacción con otras proteínas y/o cambios en su localización.

5.1 EL DOMINIO Bro1 DE PalC

Tanto PalA como PalC se caracterizan por tener un dominio Bro1 N-terminal que, como se ha demostrado, une directa y específicamente la proteína del ESCRT-III, Vps32, al igual que sucede con otras proteínas de la familia Bro1, como AIP1/ALIX ^{200,249}, homólogo en humanos de PalA ²⁴², y la proteína de *S.cerevisiae* Bro1p⁹⁶.

En el caso de PalC, la región N-terminal que se corresponde con los primeros 449 residuos constituye el dominio Bro1 de la proteína, de acuerdo con la similitud del dominio Bro1, tal y como está definido en la estructura del cristal de Bro1p ⁹⁶. En el análisis mutacional de PalC, llevado a cabo por Tilburn et al. ¹³⁵, las mutaciones de pérdida de función *palC90*, *palC113*, *palC82*, y *palC162* dan lugar a las sustituciones Pro439Phe, Arg442His y Tyr451Asn y a la delección Arg442Δ, respectivamente. Los residuos Pro439, Arg442 y Tyr451 se encuentran dentro de dos regiones muy conservadas entre Bro1p y PalC. En Bro1p, una de estas regiones, la región I, forma parte de la superficie hidrofóbica del dominio Bro1 implicada en la unión a Vps32p ⁹⁶. Dentro de esta región en PalC se encuentran los residuos Pro439 y Arg442. Las sustituciones Arg442His, así como la sustitución Arg442Ala (que también provoca la pérdida de función de PalC), disminuyen, pero no previenen, la interacción con Vps32. En cambio, la sustitución Pro439Phe y la delección Arg442Δ eliminan totalmente dicha interacción. Sin embargo, ninguno de estos cambios afecta a la estabilidad de la proteína. El hecho de que, sustituciones en PalC, que afectan a los residuos Pro439 y Arg442 que están implicados en la unión a Vps32, den lugar a un fenotipo de mimesis de acidez representa la primera demostración directa de que la interacción física entre una proteína de la ruta *pal* y una proteína del complejo ESCRT-III juega un papel fisiológico en la transducción de la señal de pH.

En la segunda de las regiones conservadas entre Bro1p y PalC, la región II, se localiza, en PalC, la Tyr 451. Esta región, que se caracteriza por ser rica en prolinas, no está incluida en la estructura de cristal del dominio Bro1, y la similitud de secuencia en dicha región entre las dos proteínas es menor que en la región I. Las sustituciones Tyr451Ala y Tyr451Asn, provocan la pérdida de función de PalC. La sustitución Tyr451Ala sí que parece afectar a la estabilidad de la proteína, como se demostró cuando se analizaron *in vivo* los niveles de

expresión de la proteína mutante con respecto a la proteína silvestre en análisis por western-blot. No obstante, el hecho de que, en ensayos de doble híbrido, la sustitución Tyr451Ala prevenga la interacción de PalC con Vps32, sin afectar a los niveles de la proteína “cebo”, sugiere que residuos situados aguas abajo de la región de PalC que se corresponden con el dominio Bro1 contribuyen a la unión con Vps32, ya sea de manera directa o indirecta (e.g. si contribuyesen al plegamiento correcto de la proteína).

El dominio Bro1 de PalC abarca la mayor parte de la proteína, a excepción de los 58 aminoácidos C-terminales, y su correcto plegamiento es crítico para su estabilidad. Truncamientos C-terminales en regiones adyacentes al dominio Bro1, o que se localizan dentro de este dominio, afectan de manera drástica a la estabilidad de la proteína. Este hecho podría explicarse por el papel que juegan los extremos del dominio Bro1 en su plegamiento, como se demuestra en la estructura del cristal del dominio Bro1 de Bro1p, donde los extremos de dicho dominio empaquetan la estructura e interaccionan con regiones conservadas ⁹⁶.

Por tanto, PalC, PalA y BroA, homólogo en *A.nidulans* de Bro1p, son las tres proteínas de la familia de proteínas con dominio Bro1 identificadas en *A. Nidulans* ¹³⁷. Dado que, el papel fisiológico de dicho dominio depende de su unión directa a Vps32, se plantea la cuestión de cómo el complejo ESCRT-III es capaz de interaccionar con las tres proteínas con dominio Bro1 a través de Vps32.

5.2 INTERACCIÓN ENTRE EL COMPLEJO ESCRT-III Y LOS COMPONENTES DE LA RUTA *pal*

La maquinaria de los complejos ESCRTs es esencial para la biogénesis de los MVBs y para la incorporación de los cargos ubiquitinados en las ILVs de los MVBs. En *S. cerevisiae* los complejos ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II se ensamblan secuencialmente en la membrana del endosoma, donde se unen directamente a la ubiquitina del cargo que va a ser internalizado, reclutando ESCRT-0 a ESCRT-I y éste a su vez a ESCRT-II.

El complejo ESCRT-III está formado por las proteínas Vp20p, Vps32p, Vps24p y Vps2p. En *S. cerevisiae* se han clasificado estas proteínas en dos subcomplejos: Vps20p/Vps32p y Vps2p/Vps24p. El subcomplejo Vps20p/Vps32p se requiere para reclutar a la membrana del endosoma el subcomplejo Vps2p/Vps24p ³⁹. Durante el ensamblaje del complejo ESCRT-III la proteína Vps20p “ceba” la polimerización de Vps32p. Por el contrario, la interacción de Vps24p con Vps32p detiene la polimerización de Vps32p y recluta a Vps2, que se une a Vps4 para iniciar la disociación del complejo. Este modelo se basa en el hecho de que Vps32p es la subunidad más abundante del complejo ESCRT-III ⁷² (Figura D.-1). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de CHMP4, homólogo humano de Vps32p, da lugar a polímeros en forma de filamentos tubulares. Estos filamentos tienen la capacidad de formar estructuras circulares o espirales en las membranas ⁷⁶. Por tanto, Vps32p es capaz de formar filamentos similares a los filamentos de actina y tubulina, con Vps20 como factor de nucleación de esos filamentos y Vps24 como factor que detiene la polimerización. Para actuar como factor de nucleación, Vps20p tiene que ser reclutado a la membrana del endosoma, gracias a un grupo miristoilo en la región C-terminal y a su interacción con la subunidad del ESCRT-II Vps25p ⁷⁰.

La formación de estos polímeros de Vps32p posiblemente dé lugar a un dominio de membrana que retiene el cargo que va a ser incorporado a las ILVs. Al contrario de lo que sucede con ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II, el ESCRT-III no se une directamente al cargo ubiquitinado, por tanto la formación de las estructuras circulares alrededor de los cargos permitiría concentrarlos en los sitios donde se va a producir la invaginación de la membrana del endosoma ⁷².

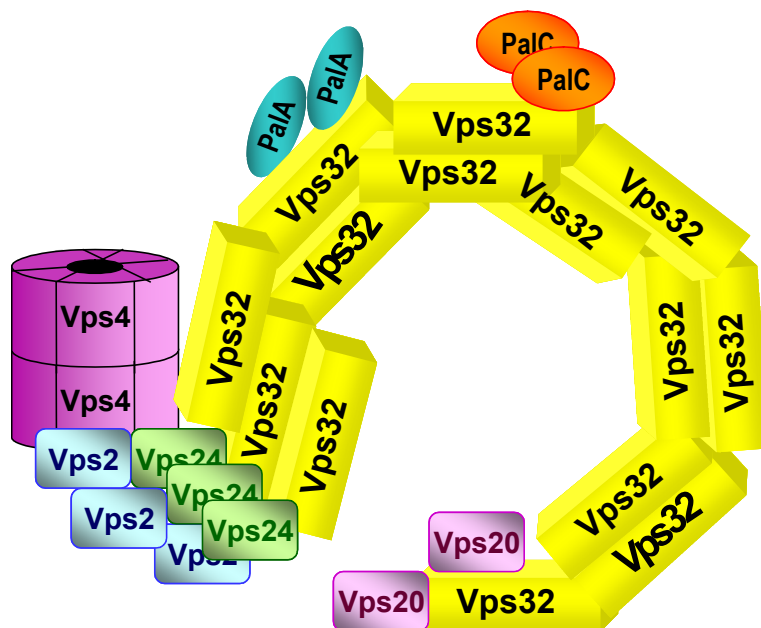


Figura D.-1: Formación de complejos multiméricos en membrana. La polimerización de la proteína del ESCRT-III Vps32p, en membranas, permitiría que las interacciones con las proteínas de la ruta de pH, o con las implicadas en la biogénesis de los MVBs, con el subcomplejo Vps20p/Vps32p no sean excluyentes. De acuerdo con el modelo propuesto por Teis et al., Vps20p actúa como factor de nucleación en la polimerización de Vps32p. Los polímeros de Vps32p son filamentos que forman estructuras espirales en las membranas. La unión de Vps24p a Vps32p termina el proceso de polimerización y recluta a Vps2p. Vps2p recluta, a su vez, a Vps4p, que desensambla el complejo ⁷³. A los polímeros formados por la subunidad Vps32, hipotéticamente, se podrían unir tanto las proteínas con dominio Bro1 de la ruta de pH, PaIA y PaIC, como BroA, Vps2 y Vps24.

En *A.nidulans* existen al menos tres proteínas que interactúan con el complejo ESCRT-III, a través de Vps32: PaIA, PaIC y BroA. La explicación a cómo el complejo ESCRT-III es capaz de interactuar con múltiples proteínas con dominio Bro1 reside en la capacidad de polimerización de Vps32 ^{72,76,79}. La polimerización de Vps32 en membranas formaría una superficie a la cual se podrían asociar diferentes proteínas. Esta hipótesis estaría de acuerdo con el fenotipo de parcial constitutividad que se observa en mutantes *vps2Δ* y *vps24Δ* de *S. cerevisiae* ¹¹⁴, por que el subcomplejo Vps2p/Vps24p del ESCRT-III se uniría a Vps32p y competiría, de alguna manera, con los interactores involucrados en la señalización por pH, mientras que en estirpes *vps2Δ* y *vps24Δ* los únicos interactores de Vps32p serían las proteínas de la ruta de pH y Bro1p. No obstante, la estequiometría del complejo ESCRT-III, que se ha determinado recientemente, ha demostrado que está formado en un 50% en masa por la subunidad Vps32p ⁷². De manera que, posiblemente, la constitutividad parcial de los mutantes, *vps2Δ vps24Δ*, no se deba únicamente a la competencia entre Vps2 y Vps24 y las proteínas de señalización por pH. En ausencia de Vps2p y Vps24p no se recluta a Vps4p (que es la AAA-Tpasa de la que depende el desensamblaje del ESCRT-III) ^{82,83} a la membrana del endosoma y, puesto que Vps24p parece ser un regulador negativo de la polimerización de Vps32, ésta tampoco se detiene ⁷². Por tanto, en los endosomas de estirpes *vps2Δ* o *vps24Δ* posiblemente exista un entramado formado por polímeros de Vps32p,

constantemente unido a la membrana y accesible a Rim20p/PalA¹¹⁰ e YGR122w/ PalC¹³⁷. En estirpes mutantes de *A. nidulans*, donde se ha deleccionado el gen *didB* (DidB es una de las proteínas accesorias del ESCRT-III, que participa en el reclutamiento de Vps4 a la membrana del endosoma), no existe una activación constitutiva de la ruta de pH, pero en ensayos de cambio de pH el corte señalizador está acelerado con respecto a la respuesta en estirpes silvestres¹⁸². La delección de *didB* seguramente provoca un desensamblaje ineficaz del complejo ESCRT-III, por lo que posiblemente se acumulen los componentes del ESCRT-III anclados a membranas.

En ensayos de doble híbrido, PalC interacciona, además de con Vps32, con Vps20. Aunque en ensayos de 2H la interacción de Vps20 con PalC parece ser relativamente más débil, comparada con la de Vps32, lo que podría explicarse si la interacción de PalC con Vps20 es indirecta (mediada por Vps32), no se puede excluir que dicha interacción sea directa. La insolubilidad de Vps20 en nuestro sistema de expresión en *E. coli* no permite abordar esta pregunta. PalA interacciona con Vps32, y al igual que PalC, tampoco interacciona con Vps2 y Vps24. A diferencia de la situación en *S. cerevisiae*, en *A. nidulans* Vps24 juega un papel en la ruta de señalización por pH al contribuir al reclutamiento de PalB al ESCRT-III¹⁸². El motivo MIM (MIT interacting motif) de Vps24 interacciona con el dominio MIT de PalB. En estirpes *palB^{ΔMIT}* que expresan la proteína PalB sin el dominio MIT, el paso de PacC⁷² a PacC⁵³ está notablemente ralentizado con respecto a una cepa silvestre. Estas estirpes tienen un fenotipo de pérdida parcial de función en los test diagnósticos de la ruta de pH¹⁸², lo que indica que la interacción entre Vps24 y PalB no es la única forma de reclutar a PalB a membranas, aunque esta interacción se requiere para el procesamiento eficiente de PacC¹⁸². En cambio, la unión de PalC con Vps32 parece ser fundamental para el procesamiento de PacC. Estirpes mutantes que expresan PalC con las sustituciones que *in vitro* previenen su unión a Vps32 tienen el fenotipo de mimesis acidez de los mutantes de pérdida total de función.

La estequiometría del complejo ESCRT-III⁷² permitiría la unión de PalC y PalA a Vps32 sin que éstos interfiriesen con la unión de Vps2, Vps24 o BroA (Figura D.-1). Vps24 facilitaría la función fisiológica de PalB en un hipotético complejo de señalización asociado al ESCRT-III. El reclutamiento de PalB a dicho complejo quizás activaría su actividad proteolítica, mientras que PalA reclutaría a PacC⁷² (a través de los motivos YPXL que flanquean la caja señalizadora en este último) a este complejo a través de su capacidad para unirse a Vps32, de manera que se pondrían en contacto la proteasa con su putativo sustrato. Sin embargo, quedaría por explicar el papel de PalC, cuya unión con Vps32 es esencial para el procesamiento de PacC.

Vps20 y Vps32 se pueden asociar a las membranas de tres formas distintas: a) a través de Vps20 que está miristoilado³⁹; b) a través de la interacción directa de la región N-terminal de Vps20 o de Vps32 a las membranas²⁵¹; c) a través de la unión de Vps20 con ESCRT-II. Como se ha mencionado anteriormente, Vps20p se une a ESCRT-II a través de Vps25p⁷⁰, una interacción que también está conservada en *A. nidulans*. De las cuatro subunidades que forman el ESCRT-III en *S. cerevisiae*,

Vps2p y Vps4p se encuentran en cantidades equimoleculares, mientras que Vps32p es la subunidad más abundante y Vps20p es la menos abundante. ESCRT-II contiene dos copias de Vps25^{69,70}, las cuales se pueden unir a dos copias de Vps20p, lo que indica que quizás se requieran varias moléculas de Vps20p para aumentar la concentración de Vps32p en la membrana del endosoma y dar lugar a la polimerización.

Una explicación muy especulativa de la posible función de PalC es que, dado que se ha detectado la interacción en doble híbrido entre Vps20 y PalC, PalC sea capaz de nuclear la polimerización de Vps32 mediante su interacción con Vps20. Esto plantea dos experimentos claves para el futuro: uno, determinar si la interacción de PalC y Vps20 es directa; y otro, demostrar que dicha interacción es específica de PalC, y que no existe también interacción entre PalA y Vps20. Si se demostrase que PalC interacciona con Vps20, mientras que PalA interacciona únicamente con Vps32, esto podría indicar que la función de PalC se sitúa aguas arriba de la de PalA, iniciando o promoviendo la polimerización de Vps32 de manera específica en respuesta a la alcalinización del medio. No obstante, la interacción entre PalC y Vps32 sitúa a PalC, junto con PalA y PalB, como componentes del hipotético complejo de la ruta de señalización por pH asociado al ESCRT-III, en contraposición con el complejo de señalización situado en membrana plasmática, del cual forma parte PalF, que como se ha demostrado, no parece interaccionar con ninguna de las “ESCRT-III like proteins”.

5.3 LA RESPUESTA DE PalC Y PalA A LA ALCALINIZACIÓN DEL PH AMBIENTAL

En *S.cerevisiae*, Boysen y Mitchell ¹⁸¹ observaron que los complejos implicados en la ruta de pH y en la biogénesis de los MVBs parecen segregar espacialmente en las membranas de los endosomas. En *S. cerevisiae*, el ortólogo de PalA, Rim20p se recluta a la membrana de los endosomas cuando se activa la ruta de pH, como consecuencia de la alcalinización del medio. En estas condiciones, la proporción de Bro1p asociada a la membrana del endosoma es menor que a pH ácido. Esto conduce a la conclusión de que, de alguna manera, la alcalinización del pH ambiental da lugar a la aparición de un dominio de membrana endosomal que favorece el ensamblaje de los complejos implicados en la señalización de pH, a expensas de los que participan en la biogénesis de los MVBs. De acuerdo con este trabajo, se esperaría que PalA estuviera asociado a endosomas cuando el pH ambiental es alcalino y que, posiblemente, suceda lo mismo con PalB y PalC dado que también interaccionan con componentes del complejo ESCRT-III.

5.3.1 LA RESPUESTA DE PalC A LA ALCALINIZACIÓN DEL PH AMBIENTAL

PalC se localiza en estructuras corticales de manera dependiente de pH, del receptor de 7-TMD PalH y de la β -arrestina PalF, lo que permite situar el papel fisiológico de PalC aguas abajo del papel del complejo situado en membrana plasmática. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Herranz et al. ¹⁸⁰, que demostraron que la función de PalC no está implicada en la fosforilación y ubiquitinación de PalF, las cuales se producen a pH alcalino de manera dependiente de PalH y parcialmente dependiente de PalI. La localización de la proteína PalC::GFP en estas estructuras corticales debe reflejar una localización fisiológica de PalC, como demuestra no sólo el hecho de que depende de la activación de la ruta *pal* (no se observa dicha localización en mutantes nulos para *palH*), sino también por el hecho de que la delección del residuo Arg442 de PalC previene su función y su reclutamiento a dichas estructuras, sin afectar aparentemente a la estabilidad de la proteína. El resto de mutaciones “missense” en PalC, que afectan a residuos de la región I del dominio Bro1 implicados en la unión

a Vps32, a pesar de dar lugar a la pérdida de función de PalC no afectan a su reclutamiento a estructuras corticales. Por tanto, el reclutamiento de PalC a dichas estructuras parecería ser independiente de Vps32. No obstante, no se puede descartar que, *in vivo*, la pérdida de afinidad resultante de una sola mutación sea insuficiente para que ésta se refleje de manera conspicua en el reclutamiento de PalC a las estructuras corticales. En estirpes con un alelo nulo de PalA, la localización de PalC::GFP es similar a la silvestre. Por tanto, el reclutamiento de PalC a estructuras corticales es independiente de PalA. Este resultado sitúa la función de PalC aguas arriba, o al mismo nivel, que la función de PalA en el complejo de señalización por pH asociado al ESCRT-III.

Dado que, el papel que juega PalC se produce aguas abajo de la ubiquitinación y fosforilación de PalF, una explicación plausible sería que PalC se reclute a sitios asociados a la membrana plasmática a través de una posible interacción con el complejo PalF/PalH. En doble híbrido, no se ha detectado tal interacción entre PalC y PalF, pero es posible que dicha interacción entre PalF y PalC necesite que la β -arrestina PalF esté fosforilada y ubiquitinada.

En mamíferos, las arrestinas se unen a los receptores 7-TMD y pueden tener un papel positivo en la transducción de la señal, ya que no sólo promueven la internalización de los receptores a los que se asocian, sino que pueden formar parte de complejos de señalización. Sin duda, uno de los mecanismos mejor estudiados en los que la transducción de señal depende de la asociación de la arrestina al receptor de 7-TMD es la activación de ciertas rutas de MAP-quinasas, mediante mecanismos que no implican la participación de las proteínas G heterotriméricas. En estos casos, la arrestina promueve la internalización del receptor y sirve de andamiaje al complejo de señalización situado en la membrana del endosoma, donde se produce la activación de las MAP-quinasas²⁵². En la ruta de pH no existe una proteína G heterotrimérica y, al igual que sucede con las arrestinas en mamíferos, PalF se ubiquitina de manera dependiente del receptor de 7-TMD. El hecho de que la arrestina PalF juegue un papel positivo en la ruta señalización por pH se ha interpretado como un indicio de que la ruta endocítica está involucrada en la transducción de la señal. De manera que, la endocitosis del complejo PalF/PalH serviría para transmitir la señal desde la membrana plasmática a la membrana de los endosomas, donde se ha demostrado que se localizan los complejos ESCRTs.

Las estructuras a las que se recluta PalC::GFP no son endosomas, dado que están asociadas a la membrana plasmática y son estáticas. En cambio, los endosomas tardíos son citosólicos y relativamente móviles, mientras que los endosomas tempranos son altamente móviles²⁵⁶. Una posibilidad es que las estructuras en las que se localiza PalC::GFP representen sitios donde se produce la ubiquitinación de PalF y que, según el modelo vigente de la ruta de pH basado en la endocitosis del complejo PalF/PalH, se podrían corresponder con sitios de internalización del complejo situado en la membrana plasmática¹³⁸.

PalH::GFP se localiza en la membrana plasmática, pero su detección requiere sobreexpresión, lo que da lugar a un marcaje uniforme de la membrana plasmática¹³⁶. Por tanto, los experimentos de colocalización entre PalC y PalH serían poco informativos.

La formación de la vesícula endocítica en hongos es un proceso dependiente de actina, que requiere la formación de acúmulos (“patches”) de actina asociados a la membrana plasmática²⁸. En *S. cerevisiae* existe una

subpoblación de estos sitios de internalización que se marcan con FM4-64²⁵⁴. Sin embargo, las estructuras corticales a las que se recluta PalC a pH alcalino no colocalizan con AbpA, uno de los marcadores tardíos de los complejos heteroligoméricos que forman los “patches” de actina, y tan sólo ocasionalmente colocalizan con el marcador temprano de estos patches SlaB y con los sitios de internalización lipídica que se marcan con FM4-64. Por tanto, se puede concluir que, no es probable que las estructuras corticales a las que se recluta PalC se correspondan con sitios canónicos de internalización endocítica.

5.3.2 LA RESPUESTA DE PalC EN UN FONDO GENÉTICO *palF*

La respuesta de PalC a la alcalinización del medio es una respuesta de tipo todo o nada: parece ser que, a partir de un cierto umbral de pH, PalC se localiza en estructuras corticales cuyo número apenas varía aunque se incrementa el pH. También se ha demostrado que, la localización de PalC en estas estructuras desaparece con el cultivo prolongado a pH alcalino. Se puede observar una respuesta rápida, o a corto plazo, a la alcalinización del medio, en la cual se produce la activación de la ruta y PalC es reclutado a las estructuras corticales. Si suponemos que estas estructuras están asociadas, de alguna manera, a los sitios donde se produce la activación del complejo de membrana plasmática, su número debería depender de la abundancia de los heterocomplejos formados por PalH, PalF y PalI. En cultivos prolongados a pH alcalino, el hongo se “adapta” a crecer en dichas condiciones de pH, y a nivel molecular PacC²⁷ es la forma predominante de PacC frente a una proporción baja de PacC⁷². La expresión del gen *palF* está regulada por pH y disminuye a pH alcalino (Múnera-Huertas, 9th European Congress on Fungal Genetics, 2008, poster Rp12); por tanto, posiblemente PacC²⁷ sea un represor de *palF*, de la misma manera que Rim101p es un represor de *RIM8*¹²⁴. Por tanto, la cantidad de PalF probablemente se reduce con la exposición continua a pH alcalino, quizás como mecanismo de regulación negativa de la ruta. La disminución de PalF podría ser la causa de la disminución del número de estructuras corticales de PalC::GFP, ya que no se formarían los complejos de PalF/PalH/PalI.

Al contrario de lo que sucede en estirpes *palH* y *palF*, en estirpes *palI* sí se produce el reclutamiento de PalC::GFP a las estructuras corticales. Sin embargo, el número de dichas estructuras corticales en las estirpes *palI* es menor que en las silvestres, y estas estructuras desaparecen de manera anormalmente rápida. Si la transducción de señal de pH requiere la endocitosis del complejo superior de membrana plasmática, probablemente, tras promover la transducción de señal, el receptor podría ser reciclado de nuevo desde los endosomas a la membrana plasmática y participar en nuevos ciclos de señalización. PalI podría jugar un papel a este nivel al facilitar este hipotético reciclaje de PalH a membrana plasmática. De manera que, en ausencia de PalI, PalH (o el complejo PalH/PalF) no volvería eficientemente a la membrana plasmática. Como se ha mencionado anteriormente, cuando se sobreexpresa PalH::GFP se localiza preferentemente en estructuras punteadas citosólicas, que podrían corresponderse con endosomas¹³⁶. Por lo tanto, es probable que, en estirpes *palI*, la proporción de PalH presente en la membrana plasmática en estado estacionario sea menor que en una estirpe silvestre, lo que explicaría el menor número de estructuras corticales de PalC que se observan en estas

cepas. La desaparición de estas estructuras, de manera anormalmente rápida en las estirpes *palI*, demuestra que, de alguna manera, *PalI* aumenta la vida media del complejo *PalH* y *PalF* en la membrana plasmática.

5.3.3 LOCALIZACIÓN DE Vps32

En los hongos filamentosos, el tráfico de membranas ha de responder a la longitud de las células y a la forma de crecimiento, que se produce exclusivamente por extensión apical. En *Ustilago maydis* y en *A. nidulans*, los endosomas tempranos se mueven bidireccionalmente asociados a los microtúbulos^{238,256,262}. Se ha demostrado que *Vps32::GFP/Vps32::mRFP* se localizan en estructuras citosólicas relativamente estáticas, que posiblemente representen endosomas tardíos o vacuolas de pequeño tamaño, y en puntos móviles que se mueven bidireccionalmente. Estos puntos representan, seguramente, endosomas que se mueven asociados a los microtúbulos que pueden, eventualmente, contactar con el córtex celular. De hecho, algunos de los endosomas móviles se mueven a lo largo de la región cortical. La localización de *PalC* en estructuras corticales y estáticas no se corresponde con que el hecho de que el interactor de *PalC* sea una proteína asociada a la membrana del endosoma. No obstante, se ha demostrado que, la interacción física entre *PalC* y *Vps32* es necesaria para la activación de *PacC*. Por tanto, durante la transducción de la señal de pH, en algún momento *PalC* y *Vps32* deben coincidir en un mismo lugar. Una posibilidad es que la localización transitoria de los endosomas que contienen *Vps32* en la proximidad de la membrana plasmática facilite la interacción entre *PalC* y *Vps32*.

La localización cortical de *PalC* y su interacción con *Vps32* indican que *PalC* podría funcionar como un nexo entre el hipotético complejo de señalización por pH asociado a la membrana plasmática y el hipotético complejo de señalización por pH asociado a la membrana del endosoma, descrito en el modelo vigente de la ruta de pH¹³⁸. Para esto, tendríamos que suponer que existe una dinámica espacio-temporal en la localización de las proteínas de la ruta *pal* en uno y otro complejo. La composición del complejo asociado a la membrana plasmática cambiaría, hipotéticamente, a lo largo del proceso de la internalización, en el caso de que se requiera la endocitosis para la transducción de la señal de pH. El papel de *PalC* en su localización cortical, asociado al complejo de membrana plasmática activado por la alcalinización del pH, sería el de reclutar a *Vps32* y, quizás, a *Vps20*. Posteriormente, se formaría el polímero de *Vps32*, que reclutaría a *PalA* y a *Vps24*, y ésta, a su vez, a *PalB* para formar el hipotético complejo de señalización por pH asociado a la membrana del endosoma, donde *PalC* ya no sería necesaria. Esta explicación especulativa justificaría por qué la localización de *PalC* en las estructuras corticales parece ser independiente de *Vps32*, pero implicaría que *Vps32* no se localizaría exclusivamente en la membrana de los endosomas.

El reclutamiento de *Vps32* a las membranas en las que se encuentra *PalC* supondría que, al igual que sucede con *PalC*, la localización de *Vps32* cambiaría en función del pH. Sin embargo, en experimentos de cambio de pH en cepas que sobreexpresan *Vps32::GFP*, no se observó un cambio evidente en la localización de la proteína de fusión. Habría que determinar en un futuro qué es lo que ocurre con la proteína *Vps32* funcional (*Vps32::GFP* no es funcional y está siempre asociada a membranas) y expresada a niveles fisiológicos, para

demostrar si realmente existe una proporción de Vps32 que se localiza en una región cortical o subcortical, además de en endosomas.

Aunque no hemos sido capaces de detectar asociación de Vps32 con la membrana plasmática, el reclutamiento de proteínas de los complejos ESCRTs a la membrana plasmática tendría precedentes. Como ya se ha comentado, ALIX y el homólogo humano de Vps23, TSG101, reclutan la maquinaria de la ruta de los MVBs a la membrana plasmática para la gemación de los retrovirus^{189,207,263}. Por otro lado, estudios de microscopía electrónica demuestran que, existe una proporción de Alix y de las proteínas de los complejos ESCRT TSG101/Vps23, HRS/Vps27 y VPS4B asociadas a la membrana plasmática²⁶⁴.

5.3.4 LA RESPUESTA DE PalA A LA ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO

Rim20 se localiza en endosomas de manera dependiente de pH y de Vps32p¹⁸¹. El modelo vigente de la ruta de transducción de pH interpreta que PalA se localiza también en endosomas¹³⁸.

PalA se localiza, además de en el citosol, en estructuras citosólicas que podrían ser endosomas, tempranos y tardíos, y en los “spindle pole bodies” (véase Discusión, apartado 5.3.6) de manera independiente de pH. Sin embargo, a pH alcalino PalA da lugar a un patrón punteado formado por estructuras con una localización aparentemente cortical. La localización de PalA en estas estructuras es dependiente no sólo de pH, sino también del receptor de 7-TMD, PalH, pero independiente de PalB. Por tanto, dicha localización depende de la activación de la ruta *pal*, lo que refuerza la idea de que se trata de una localización fisiológica de PalA y corrobora que, efectivamente, la función de PalA está aguas abajo de PalH¹⁸⁰, pero aguas arriba, o al mismo nivel, de PalB.

La localización de PalA en endosomas está, casi con certeza, mediada por su interacción con Vps32, lo que indica que existe una proporción de moléculas de PalA unida a Vps32, independientemente del pH ambiental. Las estructuras corticales en las que se localiza PalA, como consecuencia de la alcalinización del medio, son estáticas. Por tanto, estas estructuras no corresponderían con los endosomas tempranos (que son móviles), ni con los endosomas tardíos (que son estructuras citosólicas). Sin embargo, se observó que algunas de estas estructuras desaparecían tras un cierto lapso de tiempo. Esto podría deberse a que, progresivamente, se convierten en estructuras móviles y desaparecen del plano focal, o, sencillamente, a que estas estructuras estáticas tienen una determinada vida media y al cabo de cierto tiempo se desorganizan.

Al igual que sucede en *S. cerevisiae* con Rim20p, la localización de PalA cambia en respuesta a la alcalinización del medio. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con Rim20p, las estructuras en las que se localiza PalA cuando el pH del medio es alcalino no se corresponden con endosomas tempranos ni con endosomas tardíos. En *S. cerevisiae* se postula que, el cambio del pH del medio de ácido a alcalino da lugar a un cambio en el complejo ECRT-III asociado a la membrana del endosoma, que favorece la unión de Rim20p al complejo, a expensas de la unión de Bro1p. Sin duda, la localización de PalA::GFP en estructuras estáticas, aparentemente corticales, en respuesta a un pH ambiental alcalino establece una clara diferencia entre lo que ocurre en la transducción de señal de pH en *S. cerevisiae* y en *A. nidulans*. Cabe preguntarse si estas estructuras, a las que se recluta PalA, son las mismas que se observan para PalC y si representan el sitio donde se está

produciendo el corte señalizador de PacC, o bien si constituyen un paso previo en la formación del hipotético complejo situado en la membrana del endosoma, descrito en el modelo vigente de la ruta de pH¹³⁸. Para dilucidar estas cuestiones, habría que caracterizar la naturaleza de las estructuras en las que se localiza PalA, comprobar si PalA y PalC colocalizan y determinar la localización de PalB y PalF.

La localización de PalA y PalC en estructuras corticales introduce modificaciones en el modelo propuesto para la ruta de pH, basado en dos complejos espacialmente diferenciados, uno situado en membrana plasmática y otro en la membrana del endosoma¹³⁸. PalF interacciona con la cola citoplásmica de PalH, pero no interacciona con ninguna de las proteínas del ESCRT-III, al contrario que PalA, PalC o PalB, lo que parece establecer al menos una diferencia funcional entre PalF, PalH y PalI, y PalA, PalC y PalB. La ubiquitinación dependiente de pH de la β -arrestina PalF indicaría, como se ha mencionado anteriormente, que la ruta endocítica estaría implicada en la transducción de la señal. La monoubiquitinación es una de las señales que sirve para que las proteínas sean reconocidas como cargos de la maquinaria de los ESCRTs: tanto ESCRT-0, -I, -II interaccionan directamente con la ubiquitina del cargo que va a ser internalizado en los ILVs. Por tanto, no se puede descartar que en lugar de, o además de, promover la endocitosis del complejo PalF/PalH, la ubiquitinación de PalF reclute a ESCRT-0 y/o-I, y/o-II a membrana plasmática, lo que podría dar lugar al ensamblaje del ESCRT-III en la membranas plasmática de manera dependiente de pH. Esto explicaría la localización de PalC y PalA en estructuras corticales en respuesta a la alcalinización del medio, y señala a la membrana plasmática, y no a la membrana endosomal, como el lugar donde se produce el corte señalizador de PacC⁷².

Otra de las explicaciones a la localización de PalA y PalC en estructuras corticales estaría basada, como ya se ha apuntado anteriormente, en el reclutamiento de PalC a los sitios donde se produce la activación del complejo situado en membrana plasmática y en la dinámica espacio temporal en la formación del hipotético complejo asociado a la membrana del endosoma, semejante a lo que sucede en los complejos heteroligoméricos que participan en la formación de los “parches” de actina^{253,265}.

Tanto PalC como PalA interaccionan con Vps32; sin embargo, la interacción con PacC⁷², una capacidad exclusiva de PalA, sugeriría que la función de PalC está aguas arriba de la de PalA. Sin duda, un experimento de gran importancia para el futuro sería determinar qué sucede con la localización de PalA en una estirpe mutante con un alelo nulo de *palC*. Como se ha comentado anteriormente, el reclutamiento de PalC::GFP a las estructuras corticales puede ser debido a la asociación de PalC a los sitios donde tiene lugar la activación del complejo PalF/PalH. En estos sitios, PalC podría facilitar la formación de polímeros de Vps32, que reclutarían a PalA. Esto explicaría la localización de PalA, semejante a la de PalC, en respuesta a la alcalinización del medio. El papel de PalA en estas estructuras podría ser el de determinar la identidad de las membranas donde se están formando polímeros de Vps32. ALIX, el homólogo humano de PalA, interacciona con la proteína activadora de actividad GTPasa de la proteína Rab5, GAP-Rab5²⁶⁶. Las Rabs son proteínas organizadoras de dominios de membrana, que determinan la composición lipídica y/o proteica de dichos dominios. PalA podría actuar regulando la actividad de las Rabs implicadas en la formación de dominios endosomales, para establecer dominios de

“señalización por pH”. Conforme se generaran dichos dominios de “señalización por pH”, se incorporarían monómeros de Vps32, que reclutarían a PacC⁷² a través de PalA, y a PalB a través de Vps24.

Este modelo implica que, el reclutamiento de PalA a las estructuras corticales debe ser dependiente de PalC y de Vps32, lo que se verificará en un futuro, y explicaría que las estructuras en las que se localiza PalA a pH alcalino sean estáticas al comienzo del proceso de formación de dominios de pH, y móviles en un paso posterior de maduración de la membrana plasmática a endosoma.

5.3.5 LA REGIÓN C-TERMINAL DE PalC

El dominio Bro1 de PalC se define como la región que media su interacción con Vps32. La delección de la Arg442 previene el reclutamiento de PalC a estructuras corticales, posiblemente por el cambio de estructura u orientación de los residuos situados aguas abajo, que incluirían motivos implicados, directa o indirectamente, en la localización de PalC. Aguas abajo del dominio Bro1 se encuentra una región rica en prolina, de la cual forma parte la secuencia conservada que hemos denominado región II (Figura D.-2 B). Esta región rica en prolina está muy conservada en hongos *euscomycetes*, pero no tanto en hongos *basidiomycetes*, *zygomycetes* y *hemiascomycetes*. En cambio, el residuo diaromático C-terminal de PalC está conservado en los homólogos de PalC, ya sea de hongos *basidiomycetes*, de *zygomycetes* o de *ascomycetes* (Resultados, CapítuloI, apartado 4.7). Usando como diagnóstico el motivo diaromático C-terminal, y la capacidad de PalC de interaccionar con Vps32, se encontró el homólogo de PalC en *S. cerevisiae*, YGR122W, lo que, por tanto, equipara el número de componentes de la ruta RIM con los de la ruta *pal*. Se había demostrado que, YGR122wp interacciona con Vps32p^{115,247}, pero que no se trataba de una proteína Vps. En cambio, se requiere para la activación de Rim101p^{113,163} y los mutantes *ygr122wΔ*, al igual que los mutantes nulos de la ruta RIM, son hipersensibles a litio. Sin embargo, no existe complementación cruzada entre PalC e YGR122wp. Esto indica que la transducción de la señal de pH en *S. cerevisiae* y en *A. nidulans* puede tener ciertas diferencias, a pesar de que la ruta RIM y la ruta *pal* están conservadas; y, de hecho, la ruta RIM no media en la activación heteróloga de PacC en *S. cerevisiae*. Con posterioridad a la identificación de YGR122w como homólogo de PalC¹³⁷, se ha confirmado que el gen YGR122w de *Y. lipolytica* es el ortólogo de PalC, participa en la respuesta al pH ambiental, se une a Vps32 y se caracteriza por tener un motivo diaromático C-terminal¹⁶³.

La región rica en prolina y el motivo ditirosina C-terminal eran candidatos a participar en la localización de PalC en estructuras corticales, aunque no se puede descartar que exista alguna región dentro del dominio Bro1 que esté involucrada en dicha localización. Debido al grado de conservación del motivo diaromático, se decidió determinar su papel en la función de PalC. Sin embargo, a pesar de su universal conservación, en *A. nidulans* este motivo es dispensable para el procesamiento de PacC⁷². Estirpes que expresan proteínas mutantes de PalC, en las que las dos tirosinas C-terminales se sustituyeron por alaninas o bien se deleccionaron, tienen un fenotipo de hipersensibilidad muy leve a molibdato y a cloruro de litio y, a nivel molecular, un retraso muy leve en el procesamiento de PacC⁷² en la respuesta a corto plazo a la alcalinización del medio. Pudiera ser que la delección o sustitución de las dos tirosinas apenas afectase a la función de PalC porque su papel lo desempeñasen otro par

de residuos situado aguas arriba, como podrían ser la Ala497 y la Phe 498, (que están situados a tan sólo 9 residuos del extremo C-terminal). Esta interpretación no explicaría, sin embargo, su universal conservación.

5.3.6 LA LOCALIZACIÓN DE PalA EN EL NÚCLEO.

PalA (848 aa) es una proteína de mayor tamaño que PalC (507 aa). El dominio Bro1 de PalA abarca desde el residuo 4 al residuo 386. Su homólogo en humanos, ALIX, tiene una estructura formada por un dominio Bro1 N-terminal conectado por una región hidrofóbica a 3 pares de α -hélices, que forman dos haces de 3 α -hélices cada uno que se pliegan en forma de V, y una región C-terminal rica en prolina¹⁸⁹. En el dominio en forma de V se localiza la región de unión al motivo Tyr-Pro-X-Leu, mientras que la región rica en prolina media la unión de diferentes proteínas²⁴⁹ (Figura D.-2 B), entre las que se encuentra CEP55, que recluta a ALIX al anillo contráctil, denominado cuerpo medio, que se forma entre los dos centrómeros al final de la anafase^{203,204}.

La similitud de secuencia entre los ortólogos de PalA en *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, y *S. cerevisiae* y ALIX es muy alta en la región correspondiente al dominio Bro1 y al dominio V. De hecho, los residuos que participan directamente en la unión del motivo Tyr-Pro-X-Leu están conservados entre Alix y PalA (Figura D.-2 A). La unión de PalA a los motivos Tyr-Pro-X-Leu de PacC es necesaria para el procesamiento del factor de transcripción PacC^{72 100}. En cambio, en la región C-terminal rica en prolina la similitud de secuencia es mucho menor, aunque en esta región tanto PalA como ALIX se caracterizan por una frecuencia relativamente alta de residuos de prolina y glutamina (Figura D.-2 B). Esta menor similitud refleja, posiblemente, el papel de esta región en mediar interacciones específicas para cada proteína (e.g. en ALIX contiene la región de unión a la proteína CEP55, que, aparentemente, no existe en PalA).

En células que sobreexpresan PalA::GFP, se ha observado que, ésta se localiza, además de en el citosol y en endosomas tardíos, en una estructura que aparece junto a todos y cada uno de los núcleos de la célula y que podría corresponderse con los SPBs. PalA::GFP está claramente excluido de los núcleos en interfase, pero se localiza en el interior de éstos durante la mitosis. Los SPBs se duplican en fase S, antes del comienzo de la mitosis, en la que el importe nuclear se hace independientemente del gradiente de RanGTP, por que los poros nucleares se desensamblan parcialmente, lo que posiblemente facilitaría la entrada de PalA al núcleo. En el interior del núcleo, PalA se relocaliza en una estructura filamentosa que se asemeja al huso mitótico. Con la compleción de la mitosis, PalA vuelve a ser excluido del núcleo.

En estirpes que expresan PalA::GFP a niveles fisiológicos bajo el control de su propio promotor, la exclusión de PalA de los núcleos también es evidente, y se ha observado, reproduciblemente, entre las estructuras citosólicas que contienen a PalA una cierta asociación a los núcleos, aunque se carece de evidencia estadística para determinar si esta asociación es significativa. En estas estirpes, la relativamente baja intensidad de fluorescencia impide el seguimiento de PalA durante la mitosis.

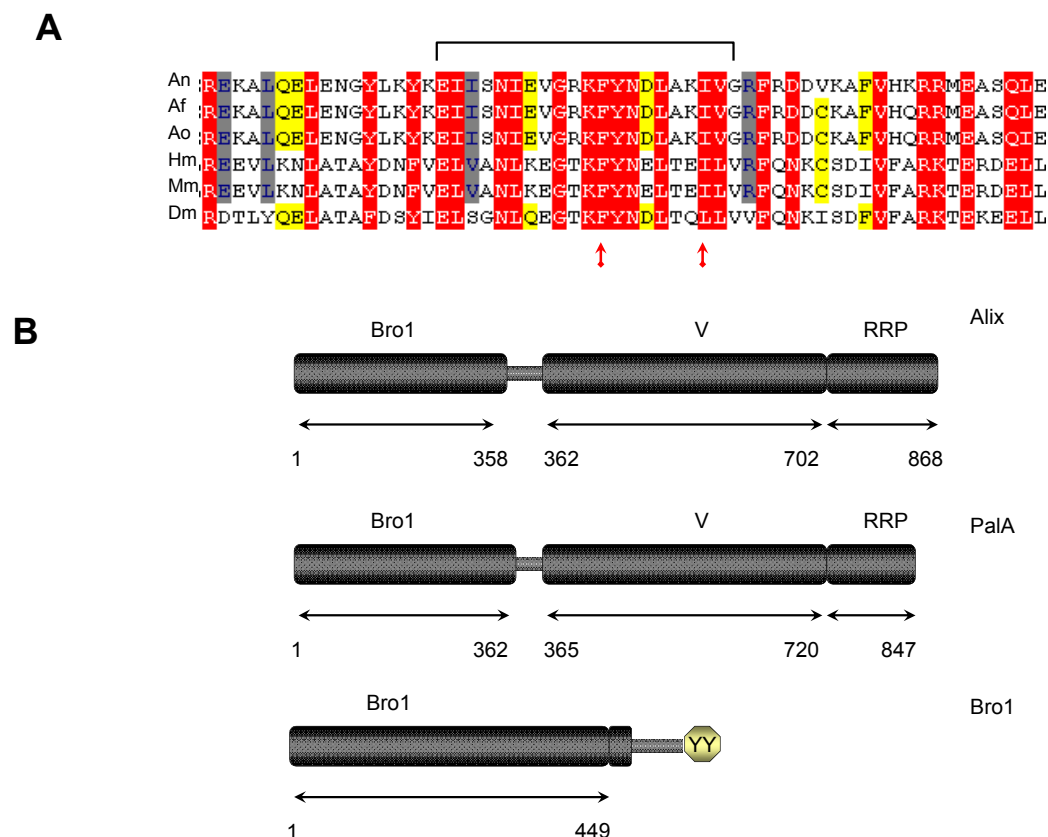


Figura D.-2: A) Alineamiento de la región del dominio V de ALIX, que interacciona con el motivo Tyr-Pro-X-Leu, con sus ortólogos en hongos *ascomycetes* (PalA), en *Mus musculus* y en *Drosophila melanogaster*. Los residuos resaltados en rojo tienen más de un 90% de similitud, los resaltados en gris oscuro entre un 50% y un 90% de similitud y los resaltados en amarillo tienen de un 30% a un 50% de similitud (de acuerdo con la matriz Blossum 62). El corchete indica la superficie que en ALIX participa en la interacción²⁴⁹ con el motivo Tyr-Pro-X-Leu y las flechas señalan los residuos cuya sustitución a Asp previene dicha interacción. An: PalA en *A. nidulans*, Af: PalA en *A. fumigatus*, Ao: PalA en *A. oryzae*, Hm: ALIX en *Homo sapiens*, Mm: ALIX en *M. musculus*, Dm ALIX en *Drosophila melanogaster*. B) Esquema que representa los dominios de las proteínas ALIX, PalA y PalC. En rojo se muestra el dominio Bro1 de cada una de las proteínas, en verde el dominio V de las proteínas ALIX y PalA, y en gris la región rica en prolinas (RRP) de estas proteínas. En PalC existe también una región rica en prolinas adyacente al dominio Bro1-like (coloreada también en gris) y un motivo ditirosina C-terminal (YY).

El aumento de la intensidad de fluorescencia, en el interior de los núcleos de las estirpes que sobreexpresan PalA::GFP durante la mitosis, no puede explicarse por la entrada de PalA al núcleo mediante simple difusión pasiva, al desensamblarse los poros nucleares al comienzo de la mitosis, ya que, en ese caso (Figura D.-3), la intensidad de fluorescencia del interior del núcleo se igualaría con la del citoplasma, pero no sería mayor. Esto indica que, PalA es reclutada directa o indirectamente (e.g. se asocia a alguna proteína) al interior del núcleo. La salida de PalA del interior de los núcleos al final de la división nuclear, y la localización estrictamente citoplásmica de PalA durante la interfase, indica que PalA es exportado activamente, de manera directa o indirecta, desde el interior del núcleo al citoplasma.

Al contrario de lo que sucede con el homólogo de PalA, ALIX, es poco probable que esta localización de PalA se corresponda con una función de la proteína en la división nuclear ya que, en mutantes nulos de PalA,

no se ha observado ningún efecto relacionado con la mitosis o con la nucleocinesis, y el fenotipo que se observa es estrictamente el fenotipo de mimesis de acidez indistinguible de los mutantes de pérdida de función en cualquiera de los otros genes *pal*. Además, en mutantes *palA1*, la localización nuclear de la proteína GFP::PacC(5-250) es semejante a la localización en una cepa silvestre ¹⁵¹. La mutación *palA1* codifica para una proteína truncada en el residuo 601 de los 851 que tiene PalA, y que contiene por tanto el dominio Bro1 y parte de la región que se corresponde con el dominio en V de ALIX, pero que no es funcional (el truncamiento en el residuo 250 de PacC da lugar a una proteína semejante a PacC²⁷, y se localiza exclusivamente en el núcleo ¹⁵¹).

Una de las hipótesis más plausibles para esta localización de PalA en los núcleos es que se asocie con otra proteína que realmente esté implicada en el proceso de división nuclear, cuya localización se vería reflejada en PalA y sería más conspicua debido a la sobreexpresión de esta última. En mamíferos, se ha comprobado que al comienzo de la mitosis se detiene la endocitosis y que ésta se activa durante la anafase ²⁶⁷. Tras la activación de la endocitosis, los endosomas tardíos se acumulan en los dos polos de la célula, donde están situados cada uno de los centrómeros, pero al final de la citocinesis parte de los endosomas migran a la región situada entre los dos centrómeros, donde se forma el surco de segmentación ²⁶⁷. Esta reorganización de los endosomas es esencial para la citocinesis y se cree que puede facilitar la abscisión ²⁶⁸. Por otro lado, la localización de los endosomas en el cuerpo medio, la constricción que se forma antes de la división de las dos células hijas, asegura un reparto simétrico de los endosomas y de las proteínas asociadas a su membrana entre las dos células. Un ejemplo de esta función sería el reparto del factor de transcripción Smad, formado R-Smad y C Smad. Bokel et al. ²⁶⁹ demostraron que SARA, que se une a R-Smad y al receptor TGF- β , se localiza en la membrana externa de los cuerpos multivesiculares. Durante la anafase, SARA se concentra en los polos de la célula, pero al final de la telofase se asocia con el cuerpo medio. De esta manera, se consigue que la células hijas tengan la misma cantidad del receptor de TGF- β y de R-Smad, al repartirse el compartimento endosomal equitativamente entre las dos células hijas, lo que en parte asegura que el nivel de respuesta al TGF- β sea equivalente en ambas células ²⁷⁰.

Por tanto, dado que Vps32 es uno de los dos interactores conocidos de PalA, puede ser que la asociación de estructuras que contienen PalA con los núcleos se deba a que estas estructuras son endosomas que contienen a Vps32. Este endosoma estaría asociado a los SPBs, el equivalente fúngico de los centrosomas. Durante la mitosis, estos endosomas serían arrastrados por cada uno de los SPBs. Aunque *A. nidulans* es un hongo cenocítico, la reorganización del compartimento endosomal asociado a la división nuclear podría cumplir una función importante, debido a que las distancias intracelulares en *A. nidulans* pueden llegar a ser relativamente grandes. La localización de PalA::GFP, a través de su interacción con Vps32, en estos endosomas, que se mueven asociados a los SPBs durante la mitosis, podría explicar las estructuras que se marcan con esta proteína de fusión. Por otro lado, la localización de PalA::GFP a los endosomas asociados a los SPBs facilitaría su entrada a los núcleos cuando se produce el desensamblaje de los poros nucleares durante la mitosis (Figura D.-3).

Una posible explicación sería que PalA::GFP entrase al núcleo arrastrado por el transporte constitutivo al interior del núcleo de PacC⁷², dependiente de la señal de localización nuclear de los dedos de zinc ¹⁵⁴, como consecuencia de la capacidad que tiene PalA de unirse a los motivos Tyr-Pro-X-Leu de PacC⁷². Esta subpoblación de PacC⁷², junto con la que entra por difusión cuando se desensamblan los poros, podría asociarse a

la cromatina y, dado que PacC⁷² tiene en su secuencia dos motivos Tyr-Pro-X-Leu de unión a PalA¹⁰⁰, pudiera ser que diera lugar a la localización parcial de PalA en el interior de los núcleos. Sin embargo, la localización de PalA en los núcleos en mitosis ocurre tanto a pH ácido como a pH alcalino. En condiciones alcalinas, la especie mayoritaria de PacC es PacC²⁷ que, aunque se localiza en el núcleo, carece de los motivos Tyr-Pro-X-Leu, y por tanto PalA no es capaz de unirse a esta forma de PacC. Estos resultados indican que, o bien la cantidad de PacC⁷² que existe en condiciones alcalinas es suficiente para localizar a PalA en el núcleo de la misma manera que a pH ácido, o bien que la entrada al núcleo de PalA es independiente de su interacción con PacC, al menos a través de los motivos Tyr-Pro-X-Leu.

Otra posible (y plausible) explicación sería que fuese Vps32 la que entrase al núcleo o estuviese asociada al núcleo y arrastrase con ella a PalA. En este caso, la función de Vps32 durante la mitosis podría ser análoga a la que parece desempeñar su homólogo en humanos, CHMP4, durante la citocinesis^{203-205,208}. Entre las funciones del ESCRT-III en mamíferos, una de ellas es participar en el proceso de abscisión durante la citocinesis, actuando en la escisión de la membrana plasmática entre las dos células hijas^{205,208}. En el caso de *A. nidulans* se tiene que dar un proceso equivalente de escisión de membranas durante la cariocinesis. Asumiendo que la cariocinesis ocurre de manera similar a la citocinesis, se debe de producir una constricción en la membrana nuclear, que se va contrayendo progresivamente hacia el centro de la célula hasta que los dos núcleos se separan. Dicha constricción se situaría en una región intermedia entre los dos SPBs y perpendicular al huso mitótico. Vps32 sería reclutada al interior del núcleo, a la región donde se forma dicha constricción (Figura D.-3). En esta región, el ensamblaje de los complejos ESCRTs y, en concreto, de los polímeros de Vps32, que se asocian a las membranas formando estructura circulares capaces de deformar la membrana⁷², facilitaría la escisión de la membrana nuclear. Aunque la localización de Vp32::GFP/Vps32mRFP demuestra que Vps32 se localiza en endosomas, no se ha estudiado su localización en relación con los núcleos a lo largo de la mitosis. No obstante, es necesario recalcar que durante la cariocinesis en *A. nidulans*, posiblemente, se requiera más de una única constricción de la membrana nuclear, ya que Osmani et al. (Osmani, 9th European Congress on Fungal Genetics, 2008, comunicación oral) observó que, al final de la mitosis, entre los dos núcleos que se dividen queda un remanente de la membrana nuclear que contiene el nucleolo. Esto indica que, deben de existir dos procesos de escisión de membranas necesarios para que la membrana nuclear se divida en tres fragmentos (los dos núcleos más el fragmento que contiene el nucleolo).

El hecho de que el complejo ESCRT-III juegue un papel relacionado con la cariocinesis y/o la septación en *A. nidulans* podría ser una de las razones por las que la delección de Vps32 o Vps24 es letal en *A. nidulans* (Calcagno et al., ESCRTs – from cell biology to patogénesis, Cambridge) pero no en *S. cerevisiae*^{39,111}, lo que nos proponemos investigar en detalle en el futuro. Dado que PalA es una proteína con dominio Bro1, la localización de PalA en el interior del núcleo podría indicar que quien realmente juega un papel durante la mitosis es BroA, la tercera de las proteínas con dominio Bro1 en *A. nidulans*. De todas formas, no se puede descartar que esta localización de PalA pudiera responder a un papel fisiológico de la proteína y que la presencia de PalA asociada al núcleo se requiera para que la regulación de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio se produzca de manera coordinada en todos los núcleos de la célula.

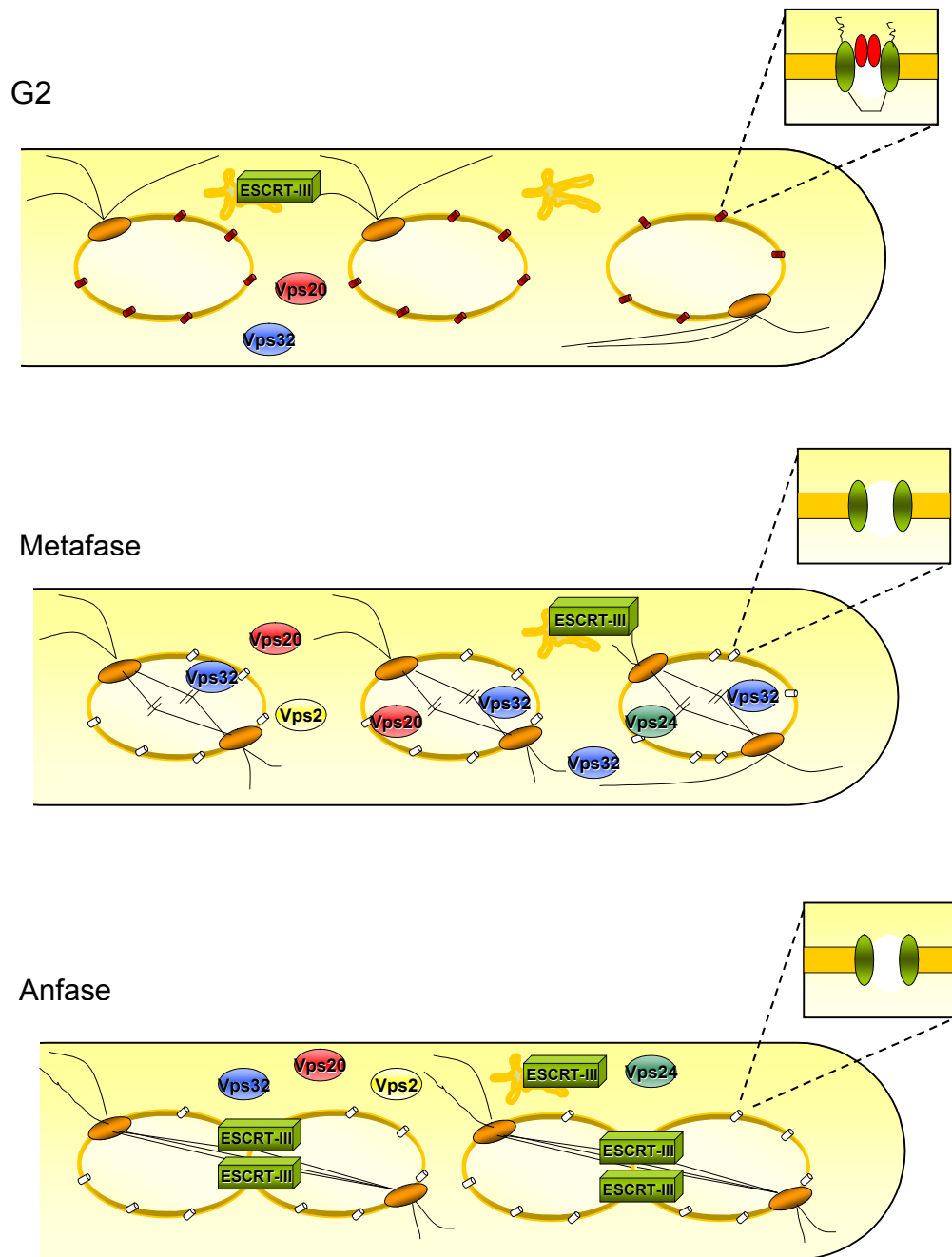


Figura D.-3: Modelo hipotético que explica la función del ESCRT-III en la cariocinesis. PalA entraría al núcleo asociado a la proteína del ESCRT-III Vps32. En interfase (i.e. G2), los complejos de los poros de la membrana nuclear (NPCs) están formados por las nucleoporinas asociadas a la membrana nuclear (cuadros a la derecha de la imagen, óvalos verdes) y las Nups que ocupan el centro canal (cuadros a la derecha de la imagen, óvalos rojos) del NPC y regulan el paso de los cargos de manera dependiente de RanGTP²¹⁷. Tras la entrada en mitosis, las Nups que forman la "portilla" interna del NPC, se desensamblan de los NPC y permiten la entrada de tubulina al interior del núcleo y la formación del huso (cuadrado a la derecha de la imagen en metafase y anafase)²¹⁹. Este desensamblaje de los poros nucleares se correlaciona con la entrada de PalA al núcleo. Durante la mitosis, los componentes del ESCRT-III Vps32, Vps20, Vps2 y Vps24 posiblemente entren al interior del núcleo (Anafase). Al final de la mitosis (Telofase), el ensamblaje del ESCRT-III en el interior del núcleo facilitaría la escisión de la membrana nuclear (Telofase). La entrada de Vps32 al interior del núcleo arrastraría a PalA.

5.4 MODELO DE PROCESAMIENTO DE PacC

En este trabajo se ha demostrado que PalC y PalA interactúan de forma directa y específica con el componente del complejo ESCRT-III Vps32 y que, en el caso de PalC, dicha interacción tiene un significado fisiológico, dado que sustituciones de un solo aminoácido que previenen dicha interacción también previenen el procesamiento de PacC. Esto implica que el complejo ESCRT-III tiene un papel positivo en la transducción de la señal por pH. También se ha demostrado que, tanto la localización de PalC como la de PalA cambian de manera dependiente de pH. El papel del resto de los componentes de la ruta *pal* en el cambio de su localización en función del pH ha permitido corroborar que la función de PalC, PalA y PalB se produce aguas abajo de la función de PalF, PalH y PalI¹⁸⁰. Al inicio de este trabajo, el modelo de la ruta de transducción de señal de pH clasificaba las proteínas de la ruta en dos complejos multiproteicos: uno formado por PalF, PalH y PalI y otro formado por PalA, PalB y al menos transitoriamente PacC. Estos dos complejos estaban separados espacialmente uno en la membrana plasmática y otro asociado a través del ESCRT-III a la membrana del endosoma. Los resultados indicados anteriormente aportan ciertos indicios sobre el modo en que se relacionan estos dos complejos. La localización de PalC y PalA en estructuras corticales, y en el caso de PalC asociadas a la membrana plasmática, cuestiona al menos en parte la formación de un complejo en la membrana del endosoma.

El sensor de pH de la ruta, la proteína de 7-TMD PalH, se localiza en la membrana plasmática, en parte gracias a la acción de PalI¹³⁶. Cuando el pH ambiental es alcalino, la β -arrestina PalF se fosforila y ubiquitina de manera dependiente de PalH¹⁸⁰ (Figura D.-4, 1). La ubiquitinación de PalF se ha interpretado clásicamente como una evidencia de que el complejo PalF/PalH se endocitaba. La endocitosis de PalF/PalH conectaría el complejo de señalización por pH en membrana plasmática con el hipotético complejo asociado a la membrana del endosoma. Sin embargo, la localización de PalA, postulado como el componente prototípico del complejo asociado a la membrana del endosoma, en estructuras corticales de manera dependiente de pH y de PalH obliga a replantear el modelo y considerar que la transducción de la señal de pH posiblemente sea distinta en *S.cerevisiae* y en *A. nidulans*. En *S. cerevisiae* Boysen et al. demuestran que la alcalinización del medio relocaliza a Rim20p del citoplasma a la membrana del endosoma y señalan que la localización de Rim20 en endosomas era algo que cabría esperar, dado que interactúa con Vps32p, una proteína asociada a la membrana del endosoma. Sin embargo, en *A. nidulans* las dos proteínas con dominio Bro1 de la ruta de pH, PalC y PalA interactúan con Vps32, pero su localización en respuesta al pH no se corresponde con endosomas ni tempranos ni tardíos.

Esto plantea la hipótesis de que la ubiquitinación de PalF actúe reclutando a la membrana el complejo ESCRT-III antes que como una señal para la endocitosis del complejo PalF/PalH. De la misma manera que los complejos ESCRT-0, -I y -II son capaces de interactuar con los cargos ubiquitinados, quizás también podrían interactuar con la proteína PalF ubiquitinada y ser reclutados a membrana plasmática. Éstos, a su vez, darían lugar al ensamblaje del ESCRT-III en la membrana plasmática, lo que explicaría la localización cortical de PalA (Figura D.-4, 2). El hecho de que, la ubiquitinación de PalF, hipotéticamente, no se correspondiese con la endocitosis del complejo PalF/PalH explicaría algunos de los resultados obtenidos con PalC. La alcalinización del pH relocaliza a PalC en estructuras corticales cerca de la membrana plasmática de manera dependiente de

PalH y PalF. El conteo de estas estructuras corticales concordaría con una regulación negativa por pH alcalino de la expresión de la β -arrestina, PalF, de manera que la disminución de la expresión de PalF, tras la exposición prolongada a pH alcalino, sería la causa de la reducción del número de estructuras corticales. Esto relaciona las estructuras corticales a las que se recluta PalC con los sitios donde tiene lugar la formación del complejo PalF/PalH. Por tanto, el hecho de que PalC::GFP no colocalice con marcadores tempranos (SlaB) o tardíos (AbpA) de los sitios de internalización endocítica, indicaría que la ubiquitinación de PalF tiene otra función, además, o en lugar, de promover endocitosis del complejo PalF/PalH. Además, la localización de PalC en estructuras corticales en mutantes, en los se supone que el tráfico entre los compartimentos endosomales está alterado (*didBA* y *rabA*), es similar a la localización en una cepa silvestre.

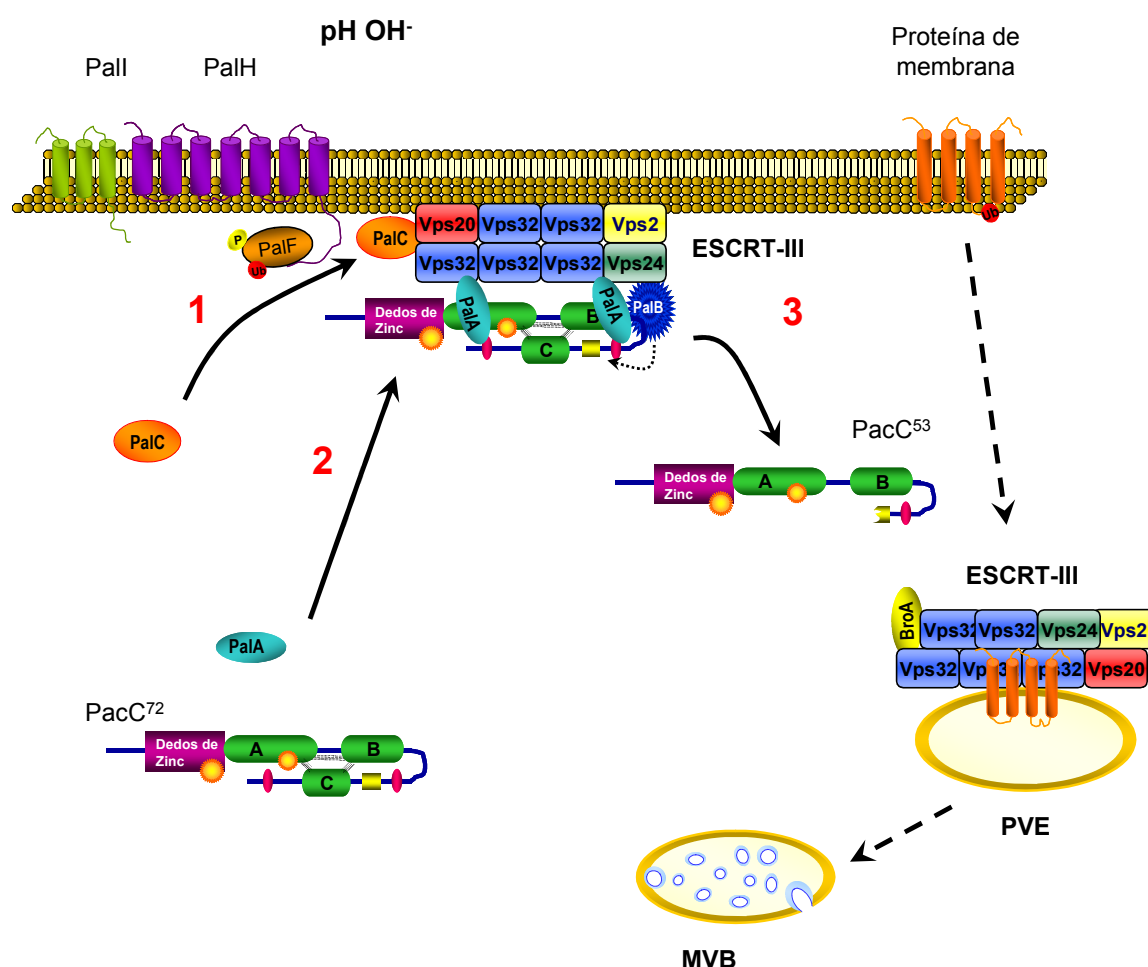


Figura D.-4: Modelo hipotético de la transducción de la señal de pH en el cual el procesamiento de PacC⁷² ocurriría en la membrana plasmática. La alcalinización del pH ambiental activaría el complejo PalF/PalH y daría lugar a la fosforilación (P, círculo amarillo) y ubiquitinación (Ub, círculo rojo) de PalF. Esto provocaría, de alguna manera, el reclutamiento de PalC a la proximidad de la membrana plasmática (1). En esta localización PalC actuaría como un factor de nucleación de la polimerización de Vps32 en la membrana plasmática. La formación de este polímero reclutaría a la membrana plasmática a PalA (2) y a los componentes del ESCRT-III Vps24 y Vps2. La capacidad de PalA de unirse a los motivos Tyr-Pro-X-Leu de PacC⁷² y la unión de PalB a Vps24 pondrían en contacto la hipotética proteasa señalizadora con su sustrato PacC⁷², que sería procesado a PacC⁵³. Finalmente, PacC⁵³ sería procesado a PacC²⁷ por la proteasa procesativa, el proteasoma.¹⁴⁷

Luego, posiblemente, al igual que sucede con el mecanismo de gemación de los retrovirus en mamíferos, donde los complejos ESCRT-III son reclutados a membrana plasmática, la ubiquitinación de PalF daría lugar, de alguna forma, al ensamblaje del ESCRT-III en la membrana plasmática de manera dependiente de pH. La unión de PalA al polímero Vps32 asociado a la membrana plasmática explica su localización cortical, pero no por qué existen dos proteínas con dominio Bro1 en la ruta de pH que interaccionan con Vps32.

Dos cuestiones claves serían, por un lado, determinar si las estructuras a las que se reclutan PalA y PalC en respuesta a la alcalinización del medio colocalizan y, por otro lado, establecer el orden de actuación en la ruta de pH de estas dos proteínas. La capacidad de PalA de unir a PacC⁷² sugiere que su función estaría aguas abajo de la de PalC, cuya localización en estructuras corticales parece ser independiente de Vps32 y dependiente de PalF. Por otra parte, no se ha detectado una interacción entre PalC y PalA, por lo que el nexo de unión entre PalC y PalA sería Vps32. Con estos datos se puede construir un modelo especulativo en el cual PalF actuaría como una señal para el ensamblaje del ESCRT-III en la membrana que implica posiblemente la acción de PalC (Figura D.-4, 1). PalA reconocería al polímero de Vps32 de este complejo ESCRT-III asociado a la membrana plasmática como un sitio de unión específico y reclutaría a PacC⁷² (Figura D.-4, 2). Por último, la proteína Vps24, actuaría como uno de los mecanismos para reclutar a PalB en la proximidad de su sustrato, bien en la membrana plasmática o en endosomas tras la internalización del complejo. Una vez que PacC⁷² se procesa a PacC⁵³, se liberaría del complejo y sería accesible al proteasoma¹⁴⁹, que lo procesa a PacC²⁷ (Figura D.-4, 3).

En el ensamblaje en la membrana plasmática del ESCRT-III en la gemación de los retrovirus, las proteínas Gag de los retrovirus reclutan a través de sus dominio L (“late domain”) a las proteínas TSG101, homóloga de Vps23, y ALIX, homóloga de PalA y BroA. La unión de TSG101 a la proteína a la Gag del virus HIV-1 se produce a través de un motivo PTAP que es reconocido por el dominio UEV (ubiquitin E2 variant). Este dominio reconoce tanto a PTAP como a la ubiquitina. La ubiquitinación aumenta diez veces la afinidad de la interacción entre la Gag y TSG101^{272,273}. La unión a TSG101 da lugar al ensamblaje del ESCRT-I en la membrana plasmática y recluta al complejo ESCRT-III, aparentemente de manera independiente de ESCRT-II²¹⁴. Alternativamente, la Gag del HIV-1 se une también a ALIX, el cual recluta a ESCRT-III a la membrana plasmática, a través de la interacción con Vps32. En otros retrovirus también hay una participación directa de ciertas ubiquitin-ligasas que interaccionan con la proteína Gag del retrovirus y promueven el reclutamiento de ESCRT-III²¹⁴.

Estos datos indican que, en el hipotético caso de que del complejo ESCRT-III se reclute a la membrana plasmática de manera dependiente de pH, la ubiquitinación de PalF podría actuar reclutando a ESCRT-I y/o interaccionando con PalC, que podría servir de nexo de unión entre PalF y Vps32. El papel de PalC, como un factor que mediaría la nucleación de los polímeros de Vps32 en respuesta a la señal de pH, estaría basado en el hecho de que la sobreexpresión de Vps32 no afecta a la localización de PalC, ya que la localización de PalC es exclusivamente dependiente de pH. Además, este papel estaría de acuerdo con la interacción detectada en doble híbrido entre PalC y Vps20 que, como se ha mencionado, ceba la polimerización de Vps32 durante el ensamblaje del ESCRT-III.

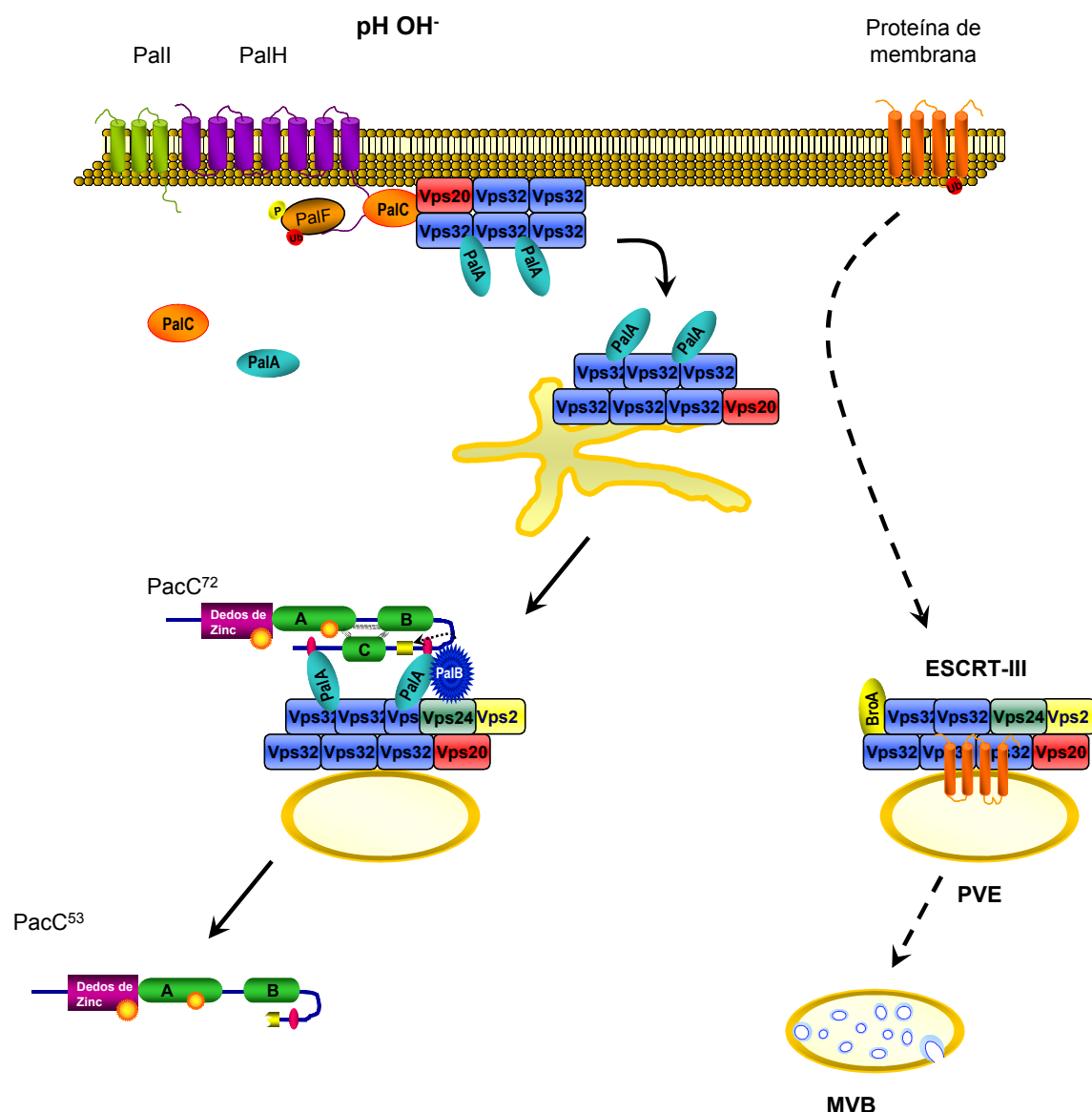


Figura D.-5: Modelo hipotético de la transducción de la señal pH en el cual el procesamiento de PacC⁷² ocurriría en la membrana del endosoma. La alcalinización del pH ambiental activaría el complejo PalF/PalH y daría lugar a la fosforilación (P, círculo amarillo) y ubiquitinación (Ub, círculo rojo) de PalF. Esto provocaría, de alguna manera, el reclutamiento de PalC a la proximidad de la membrana plasmática. En esta localización, PalC reclutaría a Vps32. PalA se uniría a los polímeros de Vps32 y determinaría la identidad de membrana creando un dominio específico de señalización por pH en el sitio de internalización del complejo PalF/PalH. Debido a la endocitosis del complejo PalF/PalH, Vps32/PalA llega a la membrana del endosoma. En esta localización, PalA reclutaría a PacC⁷² y se uniría al complejo Vps24, que actuaría reclutando a PalB. PalB que procesaría entonces PacC⁷² a PacC⁵³.

Los datos obtenidos en esta tesis cuestionan claramente o demandan una modificación del modelo de la ruta de transducción de la señal de pH en *A. nidulans* como ejemplo de transducción de señal asociada a vesículas (VAST, vesicle-associated signal transduction)^{138,198}. La participación de los complejos ESCRTs en la ruta de pH sería un nuevo ejemplo de que estos complejos se comportan como una maquinaria modular, que desempeña

distintas funciones en diferentes localizaciones y procesos biológicos, y que en el caso de la ruta de pH es reclutada a su sitio de actuación a través de la ubiquitinación/fosforilación de PalF y de PalC.

No obstante, no se puede descartar que la ubiquitinación de PalF de lugar a la endocitosis de PalF/PalH, pero quizás más como un mecanismo de desensibilización de la ruta, que como un mecanismo que participe realmente en la transducción de la señal. En estirpes *palI*, la desaparición de las estructuras corticales en cultivo prolongados a pH alcalino es muchos más acusada; luego, la función de PalI sería la de estabilizar, de alguna manera, el complejo activo PalF/PalH, ya sea previniendo la acción de alguna deubiquitinasa, o incluso previniendo la endocitosis del complejo. Tampoco se puede descartar un modelo “híbrido”, en el que la endocitosis del complejo múltiple sea necesaria para la activación de PalB en endosomas.

El modelo basado en el reclutamiento de ESCRT-III a la membrana plantea un problema, ya que no se ha observado la localización en la membrana plasmática de Vps32::GFP o Vps32::mRFP, quizás por que la mayor parte de Vps32 se recluta a los endosomas y que tan sólo una fracción muy pequeña se recluta a membrana plasmática de manera dependiente de pH. No obstante, en cualquier modelo basado en la endocitosis del complejo PalF/PalH, para explicar la localización cortical de PalC y PalA, también se tendría que detectar una localización cuanto menos transitoria de Vps32 en membrana plasmática.

El modelo alternativo basado en la endocitosis (Figura D.-5) implicaría que existe un proceso de internalización y maduración desde la membrana plasmática al endosoma, que se apoyaría en que las estructuras en las que se localiza PalA no son únicamente estáticas, sino que ocasionalmente se observan estructuras móviles y citosólicas, lo que indicaría que se ha producido el paso desde los sitios de internalización (estructuras estáticas) a los endosomas tempranos (estructuras móviles). PalC también actuaría reclutando a Vps32 a membrana plasmática, y Vps32 a su vez reclutaría a PalA. En esta localización cortical el papel de PalA podría ser el de dar identidad a un hipotético “dominio” endosomal de señalización por pH. Durante la maduración a endosoma, la función de PalC dejaría de ser útil, dado que ya se habría producido la polimerización de Vps32. Las membranas con Vps32 y PalA reclutarían a PacC⁷² a través de los dos dominios Tyr-Pro-X-Leu de PacC⁷². Finalmente, se asociaría a este complejo Vps24 que reclutaría a PalB (Figura D.-5)

La existencia de dos complejos funcionales en la ruta de transducción de pH en *A. nidulans* sigue siendo válida. El complejo de señalización en membrana plasmática da lugar a la transducción de la señal, lo que provocaría la formación de un complejo heteroligomérico en el cual PalC, PalA y PalB actuarían, posiblemente, de manera secuencial, ya sea reclutando a ESCRT-III para su participación en la ruta de pH o siendo reclutadas por este complejo. En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo indican que, es más probable que el ensamblaje de este complejo heteroligomérico se produzca en la membrana plasmática y no en la membrana del endosoma.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. PalC se necesita para que el corte señalizador de PacC tenga lugar
2. La activación de la ruta *pal* no causa una modificación post-traducciona evidente de PalC ni altera los niveles de la proteína.
3. PalC interacciona específica y directamente con la proteína del complejo ESCRT-III Vps32
4. Las interacciones observadas entre las proteínas que forman el complejo ESCRT-III en *A. nidulans* están conservadas con *S. cerevisiae* y metazoos.
5. La interacción entre PalC y Vps32 está mediada en parte por un dominio Bro1 N-terminal, en el cual se han identificado una región conservada que contiene residuos que juegan un papel importante en dicha interacción. Existe una segunda región conservada adyacente al dominio Bro1 que juega también un papel en la interacción con Vps32
6. La interacción entre PalC y Vps32 es necesaria para la activación de PacC.
7. PalC se localiza en estructuras corticales de manera dependiente de pH, del receptor de 7-TMD PalH y de la β -arrestina PalF e independiente de PalA. Por tanto, el papel que juega PalC está aguas abajo del complejo de señalización en membrana plasmática, pero aguas arriba, o al mismo nivel, que el complejo de señalización asociado a ESCRT-III.
8. Las estructuras corticales en la que se localiza PalC a pH neutro o alcalino no son sitios de internalización endocítica.
9. La localización de PalC en las estructuras corticales parece ser independiente de su interacción con Vps32, así como de la función de DidB, una proteína accesoria del complejo ESCRT-III y de la función de RabA, una GTPasa monomérica que juega un papel en los endosomas tempranos implicada en tráfico de membranas.
10. El motivo ditirosina C-terminal conservado de PalC es casi totalmente dispensable para el procesamiento de PacC.
11. *YGR122W* es el ortólogo de *palC* en *S. cerevisiae*.
12. La activación de la ruta *pal* no causa una modificación post-traducciona evidente de PalA
13. PalA interacciona directamente con la proteína del complejo ESCRT-III Vps32
14. PalA se recluta a estructuras corticales de manera dependiente de pH y del receptor de 7-TMD PalH, pero de manera independiente de PalB, lo que concuerda con el papel atribuido a PalA aguas abajo del complejo de señalización por pH ambiental y aguas arriba o al mismo nivel que PalB.
15. En interfase PalA se localiza en el citoplasma, en endosomas y en estructuras que parecen estar asociadas a los “spindle pole bodies”. Durante la mitosis PalA se localiza, además, en el interior de los núcleos. Esta localización de PalA podría reflejar una función de Vps32 durante la mitosis.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Thom,C. & Raper,K.B. A manual of the *Aspergilli*. (1945).
2. Pontecorvo,G., Roper J.A., Hemmons,L.M., & Macdonald,K.K. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 141-238 (1953).
3. Adams,T.H., Wieser,J.K., & Yu,J.H. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 35-54 (1998).
4. Peñalva,M.A. A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: alkaptonuria and beyond. *Fungal. Genet. Biol.* **34**, 1-10 (2001).
5. Galagan,J.E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115 (2005).
6. Grandal,M.V. & Madhus,I.H. Epidermal Growth Factor Receptor and Cancer: Control of Oncogenic Signalling by Endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* (2008).
7. Czech,M.P. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 791-815 (2003).
8. Casselton,L. & Zolan,M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 683-697 (2002).
9. Timberlake,W.E. Molecular Genetics of *Aspergillus* Development. *Annual Review of Genetics* **24**, 5-36 (1990).
10. Pelham,H.R.B. Insights from yeast endosomes. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 454-462 (2002).
11. Leabu,M. Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J. Cell Mol. Med.* **10**, 423-427 (2006).
12. Lewis,M.J., Nichols,B.J., Prescianotto-Baschong,C., Riezman,H., & Pelham,H.R. Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 23-38 (2000).
13. Gillooly,D.J., Morrow,I.C., Lindsay,M., Gould,R., Bryant,N.J., Gaullier,J.M., Parton,R.G., & Stenmark,H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**, 4577-4588 (2000).
14. Cowles,C.R., Odorizzi,G., Payne,G.S., & Emr,S.D. The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-118 (1997).
15. Kirchhausen,T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 705-732 (1999).
16. Phillips,S.A., Barr,V.A., Haft,D.H., Taylor,S.I., & Haft,C.R. Identification and Characterization of SNX15, a Novel Sorting Nexin Involved in Protein Trafficking. *J. Biol. Chem.* **276**, 5074-5084 (2001).
17. Bonifacino,J.S. & Hurley,J.H. Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 427-436 (2008).
18. Black,M.W. & Pelham,H.R.B. A Selective Transport Route from Golgi to Late Endosomes that Requires the Yeast GGA Proteins. *J. Cell Biol.* **151**, 587-600 (2000).

19. McNiven, M.A. & Thompson, H.M. Vesicle Formation at the Plasma Membrane and Trans-Golgi Network: The Same but Different. *Science* **313**, 1591-1594 (2006).
20. Prescianotto-Baschong, C. & Riezman, H. Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell* **9**, 173-189 (1998).
21. Prescianotto-Baschong, C. & Riezman, H. Ordering of Compartments in the Yeast Endocytic Pathway. *Traffic* **3**, 37-49 (2002).
22. Pelham, H.R.B. SNAREs and the Secretory Pathway--Lessons from Yeast. *Experimental Cell Research* **247**, 1-8 (1999).
23. Levine, T.P. & Munro, S. Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr. Biol.* **12**, 695-704 (2002).
24. Burd, C.G., Babst, M., & Emr, S.D. Novel pathways, membrane coats and PI kinase regulation in yeast lysosomal trafficking. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 527-533 (1998).
25. Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N., & Mayinger, P. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr. Biol.* **11**, 1421-1426 (2001).
26. Pfeffer, S.R. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* **11**, 487-491 (2001).
27. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117 (2001).
28. Araujo-Bazán, L., Penalva, M.A., & Espeso, E.A. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**, 891-905 (2008).
29. Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazan, L., Dou, X., Espeso, E.A., Penalva, M.A., Osmani, S.A., & Oakley, B.R. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1439-1449 (2008).
30. Hershko, A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death. Differ.* **12**, 1191-1197 (2005).
31. Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503-533 (2001).
32. Hettema, E.H., Valdez-Taubas, J., & Pelham, H.R. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.* **23**, 1279-1288 (2004).
33. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428 (2002).
34. Hicke, L. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530 (2001).
35. Katzmann, D.J., Odorizzi, G., & Emr, S.D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 893-905 (2002).
36. Haglund, K., Di Fiore, P.P., & Dikic, I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 598-603 (2003).

37. Williams,R.L. & Urbe,S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 355-368 (2007).
38. Katzmann,D.J., Babst,M., & Emr,S.D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-155 (2001).
39. Babst,M., Katzmann,D.J., Estepa-Sabal,E.J., Meerloo,T., & Emr,S.D. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* **3**, 271-282 (2002).
40. Reggiori,F. & Pelham,H.R.B. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* **4**, 117-123 (2002).
41. McNatt,M.W., McKittrick,I., West,M., & Odorizzi,G. Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 697-706 (2007).
42. Berson,J.F., Theos,A.C., Harper,D.C., Tenza,D., Raposo,G., & Marks,M.S. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **161**, 521-533 (2003).
43. Bonangelino,C.J., Chavez,E.M., & Bonifacino,J.S. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2486-2501 (2002).
44. Raymond,C.K., Howald-Stevenson,I., Vater,C.A., & Stevens,T.H. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1389-1402 (1992).
45. Banta,L.M., Robinson,J.S., Klionsky,D.J., & Emr,S.D. Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J. Cell Biol.* **107**, 1369-1383 (1988).
46. Nickerson,D.P., West,M., & Odorizzi,G. Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J. Cell Biol.* **175**, 715-720 (2006).
47. Babst,M., Katzmann,D.J., Snyder,W.B., Wendland,B., & Emr,S.D. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* **3**, 283-289 (2002).
48. Piper,R.C. & Katzmann,D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 519-547 (2007).
49. Hurley,J.H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 4-11 (2008).
50. Hurley,J.H. & Emr,S.D. THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **35**, 277-298 (2006).
51. Prag,G., Watson,H., Kim,Y.C., Beach,B.M., Ghirlando,R., Hummer,G., Bonifacino,J.S., & Hurley,J.H. The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev. Cell* **12**, 973-986 (2007).
52. Raiborg,C., Bremnes,B., Mehlum,A., Gillooly,D.J., D'Arrigo,A., Stang,E., & Stenmark,H. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell Sci.* **114**, 2255-2263 (2001).

53. Urbe,S., Mills,I.G., Stenmark,H., Kitamura,N., & Clague,M.J. Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7685-7692 (2000).
54. Raiborg,C., Bache,K.G., Gillooly,D.J., Madshus,I.H., Stang,E., & Stenmark,H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* **4**, 394-398 (2002).
55. Urbe,S., Sachse,M., Row,P.E., Preisinger,C., Barr,F.A., Strous,G., Klumperman,J., & Clague,M.J. The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation. *J. Cell Sci.* **116**, 4169-4179 (2003).
56. ter Haar,E., Harrison,S.C., & Kirchhausen,T. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 1096-1100 (2000).
57. Sachse,M., Strous,G.J., & Klumperman,J. ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles. *J. Cell Sci.* **117**, 1699-1708 (2004).
58. Hislop,J.N., Marley,A., & Von Zastrow,M. Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **279**, 22522-22531 (2004).
59. Bilodeau,P.S., Winistorfer,S.C., Kearney,W.R., Robertson,A.D., & Piper,R.C. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J. Cell Biol.* **163**, 237-243 (2003).
60. Katzmann,D.J., Stefan,C.J., Babst,M., & Emr,S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**, 413-423 (2003).
61. Pornillos,O., Alam,S.L., Rich,R.L., Myszka,D.G., Davis,D.R., & Sundquist,W.I. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J.* **21**, 2397-2406 (2002).
62. Tong,A.H., Drees,B., Nardelli,G., Bader,G.D., Brannetti,B., Castagnoli,L., Evangelista,M., Ferracuti,S., Nelson,B., Paoluzi,S., Quondam,M., Zucconi,A., Hogue,C.W., Fields,S., Boone,C., & Cesareni,G. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321-324 (2002).
63. Kostelansky,M.S., Schluter,C., Tam,Y.Y., Lee,S., Ghirlando,R., Beach,B., Conibear,E., & Hurley,J.H. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* **129**, 485-498 (2007).
64. Babst,M. A Protein's Final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9 (2005).
65. D.J Gill, Hsiangling Teo, Ji Sun, Olga Perisic, Dmitry B Veprintsev, Scott D Emr, & Roger L Williams Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO journal* **26**, 600-612 (2007).
66. Oestreich,A.J., Davies,B.A., Payne,J.A., & Katzmann,D.J. Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 646-657 (2007).
67. Saksena,S., Sun,J., Chu,T., & Emr,S.D. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 561-573 (2007).

68. Teo,H., Gill,D.J., Sun,J., Perisic,O., Veprintsev,D.B., Vallis,Y., Emr,S.D., & Williams,R.L. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* **125**, 99-111 (2006).
69. Hierro,A., Sun,J., Rusnak,A.S., Kim,J., Prag,G., Emr,S.D., & Hurley,J.H. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* **431**, 221-225 (2004).
70. Teo,H., Perisic,O., Gonzalez,B., & Williams,R.L. ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting: Crystal Structure and Interactions with ESCRT-III and Membranes. *Developmental Cell* **7**, 559-569 (2004).
71. Yorikawa,C., Shibata,H., Waguri,S., Hatta,K., Horii,M., Katoh,K., Kobayashi,T., Uchiyama,Y., & Maki,M. Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem. J.* **387**, 17-26 (2005).
72. Teis,D., Saksena,S., & Emr,S.D. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* **15**, 578-589 (2008).
73. Muziol,T., Pineda-Molina,E., Ravelli,R.B., Zamborlini,A., Usami,Y., Gottlinger,H., & Weissenhorn,W. Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. *Developmental Cell* **10**, 821-830 (2006).
74. Zamborlini,A., Usami,Y., Radoshitzky,S.R., Popova,E., Palu,G., & Gottlinger,H. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19140-19145 (2006).
75. Shim,S., Kimpler,L.A., & Hanson,P.I. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic*. **8**, 1068-1079 (2007).
76. Hanson,P.I., Roth,R., Lin,Y., & Heuser,J.E. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* **180**, 389-402 (2008).
77. Yeo,S.C.L., Xu,L., Ren,J., Boulton,V.J., Wagle,M.D., Liu,C., Ren,G., Wong,P., Zahn,R., Sasajala,P., Yang,H., Piper,R.C., & Munn,A.L. Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **116**, 3957-3970 (2003).
78. Peck,J.W., Bowden,E.T., & Burbelo,P.D. Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins. *Biochem. J.* **377**, 693-700 (2004).
79. Lata,S., Schoehn,G., Jain,A., Pires,R., Piehler,J., Gottlinger,H.G., & Weissenhorn,W. Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* **321**, 1354-1357 (2008).
80. Ghazi-Tabatabai,S., Saksena,S., Short,J.M., Pobbati,A.V., Veprintsev,D.B., Crowther,R.A., Emr,S.D., Egelman,E.H., & Williams,R.L. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure*. **16**, 1345-1356 (2008).
81. Vajjhala,P.R., Wong,J.S., To,H.Y., & Munn,A.L. The beta domain is required for Vps4p oligomerization into a functionally active ATPase. *FEBS Journal* **273**, 2357-2373 (2006).
82. Obita,T., Saksena,S., Ghazi-Tabatabai,S., Gill,D.J., Perisic,O., Emr,S.D., & Williams,R.L. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* **449**, 735-739 (2007).

83. Babst,M., Wendland,B., Estepa,E.J., & Emr,S.D. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982-2993 (1998).
84. Lottridge,J.M., Flannery,A.R., Vincelli,J.L., & Stevens,T.H. Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 6202-6207 (2006).
85. Stuchell-Brereton,M.D., Skalicky,J.J., Kieffer,C., Karren,M.A., Ghaffarian,S., & Sundquist,W.I. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* **449**, 740-744 (2007).
86. Azmi,I., Davies,B., Dimaano,C., Payne,J., Eckert,D., Babst,M., & Katzmann,D.J. Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J. Cell Biol.* **172**, 705-717 (2006).
87. Vajjhala,P.R., Catchpoole,E., Nguyen,C.H., Kistler,C., & Munn,A.L. Vps4 regulates a subset of protein interactions at the multivesicular endosome. *FEBS Journal* **274**, 1894-1907 (2007).
88. Scott,A., Chung,H.Y., Gonciarz-Swiatek,M., Hill,G.C., Whitby,F.G., Gaspar,J., Holton,J.M., Viswanathan,R., Ghaffarian,S., Hill,C.P., & Sundquist,W.I. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J.* **24**, 3658-3669 (2005).
89. Yu,Z., Gonciarz,M.D., Sundquist,W.I., Hill,C.P., & Jensen,G.J. Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J. Mol. Biol.* **377**, 364-377 (2008).
90. Gonciarz,M.D., Whitby,F.G., Eckert,D.M., Kieffer,C., Heroux,A., Sundquist,W.I., & Hill,C.P. Biochemical and Structural Studies of Yeast Vps4 Oligomerization. *J. Mol. Biol.* (2008).
91. Azmi,I.F., Davies,B.A., Xiao,J., Babst,M., Xu,Z., & Katzmann,D.J. ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev. Cell* **14**, 50-61 (2008).
92. Dimaano,C., Jones,C.B., Hanono,A., Curtiss,M., & Babst,M. Ist1 Regulates Vps4 Localization and Assembly. *Mol. Biol. Cell* E07-E08 (2007).
93. Rue,S.M., Mattei,S., Saksena,S., & Emr,S.D. Novel Ist1-Did2 Complex Functions at a Late Step in MVB Sorting. *Mol. Biol. Cell* E07 (2007).
94. Amerik,A.Y. & Hochstrasser,M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 189-207 (2004).
95. Amerik,A., Sindhi,N., & Hochstrasser,M. A conserved late endosome-targeting signal required for Doa4 deubiquitylating enzyme function. *J. Cell Biol.* **175**, 825-835 (2006).
96. Kim,J., Sitaraman,S., Hierro,A., Beach,B.M., Odorizzi,G., & Hurley,J.H. Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev. Cell* **8**, 937-947 (2005).
97. Luhtala,N. & Odorizzi,G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* **166**, 717-729 (2004).
98. Luhtala,N. & Odorizzi,G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* **166**, 717-729 (2004).
99. Richter,C., West,M., & Odorizzi,G. Dual mechanisms specify Doa4-mediated deubiquitination at multivesicular bodies. *EMBO J.* **26**, 2454-2464 (2007).

100. Vincent,O., Rainbow,L., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1647-1655 (2003).
101. Li,L., Liao,J., Ruland,J., Mak,T.W., & Cohen,S.N. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1619-1624 (2001).
102. Thompson,B.J., Mathieu,J., Sung,H.H., Loeser,E., Rorth,P., & Cohen,S.M. Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila. *Dev. Cell* **9**, 711-720 (2005).
103. Vaccari,T. & Bilder,D. The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev. Cell* **9**, 687-698 (2005).
104. Moberg,K.H., Schelble,S., Burdick,S.K., & Hariharan,I.K. Mutations in erupted, the Drosophila ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev. Cell* **9**, 699-710 (2005).
105. Slagsvold,T., Pattni,K., Malerod,L., & Stenmark,H. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* **16**, 317-326 (2006).
106. Schmidt,M.H., Chen,B., Randazzo,L.M., & Bogler,O. SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J. Cell Sci.* **116**, 2845-2855 (2003).
107. Cabezas,A., Bache,K.G., Brech,A., & Stenmark,H. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J. Cell Sci.* **118**, 2625-2635 (2005).
108. Kamura,T., Burian,D., Khalili,H., Schmidt,S.L., Sato,S., Liu,W.J., Conrad,M.N., Conaway,R.C., Conaway,J.W., & Shilatifard,A. Cloning and characterization of ELL-associated proteins EAP45 and EAP20. a role for yeast EAP-like proteins in regulation of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.* **276**, 16528-16533 (2001).
109. Stauffer,D.R., Howard,T.L., Nyun,T., & Hollenberg,S.M. CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. *J. Cell Sci.* **114**, 2383-2393 (2001).
110. Xu,W. & Mitchell,A.P. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* **183**, 6917-6923 (2001).
111. Xu,W., Smith,F.J., Jr., Subaran,R., & Mitchell,A.P. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5528-5537 (2004).
112. Kullas,A.L., Li,M., & Davis,D.A. Snf7p, a Component of the ESCRT-III Protein Complex, Is an Upstream Member of the RIM101 Pathway in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **3**, 1609-1618 (2004).
113. Rothfels,K., Tanny,J.C., Molnar,E., Friesen,H., Commisso,C., & Segall,J. Components of the ESCRT pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **25**, 6772-6788 (2005).
114. Hayashi,M., Fukuzawa,T., Sorimachi,H., & Maeda,T. Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell Biol.* **25**, 9478-9490 (2005).

115. Ito,T., Chiba,T., Ozawa,R., Yoshida,M., Hattori,M., & Sakaki,Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 4569-4574 (2001).
116. Rodríguez-Galán,O., Galindo,A., Hervás-Aguilar,A., Arst,H.N., & Penalva,M.A. Physiological involvement in pH signalling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* (2008).
117. Rossi,A. & Arst,H.N., Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 51-53 (1990).
118. Caddick,M.X., Brownlee,A.G., & Arst,H.N., Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 346-353 (1986).
119. Peñalva,M.A. & Arst,H.N., Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426-46, table (2002).
120. Peñalva,M.A. & Arst,H.N., Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 425-451 (2004).
121. Arst,H.N., Jr., Rand,K.N., & Bailey,C.R. Do the tightly linked structural genes for nitrate and nitrite reductases in *Aspergillus nidulans* form an operon? Evidence from an insertional translocation which separates them. *Mol. Gen. Genet.* **174**, 89-100 (1979).
122. Bailey,C.R., Penfold,H.A., & Arst,H.N., Jr. Cis-dominant regulatory mutations affecting the expression of GABA permease in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **169**, 79-83 (1979).
123. Davis,D.A., Bruno,V.M., Loza,L., Filler,S.G., & Mitchell,A.P. *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**, 1573-1581 (2002).
124. Lamb,T.M. & Mitchell,A.P. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **23**, 677-686 (2003).
125. Viladevall,L., Serrano,R., Ruiz,A., Domenech,G., Giraldo,J., Barcelo,A., & Arino,J. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 43614-43624 (2004).
126. Spielvogel,A., Findon,H., Arst,H.N., Araujo-Bazan,L., Hernandez-Ortiz,P., Stahl,U., Meyer,V., & Espeso,E.A. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SlrA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* **414**, 419-429 (2008).
127. Arst,H.N. & Penalva,M.A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* **19**, 224-231 (2003).
128. Arst,H.N., Jr., Bignell,E., & Tilburn,J. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 787-790 (1994).
129. Tilburn,J., Sarkar,S., Widdick,D.A., Espeso,E.A., Orejas,M., Mungroo,J., Penalva,M.A., & Arst,H.N., Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790 (1995).

130. Denison,S.H., Orejas,M., & Arst,H.N., Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 28519-28522 (1995).
131. Maccheroni,W., Jr., May,G.S., Martinez-Rossi,N.M., & Rossi,A. The sequence of palF, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**, 163-167 (1997).
132. Negrete-Urtasun,S., Denison,S.H., & Arst,H.N., Jr. Characterization of the pH signal transduction pathway gene palA of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* **179**, 1832-1835 (1997).
133. Denison,S.H., Negrete-Urtasun,S., Mingot,J.M., Tilburn,J., Mayer,W.A., Goel,A., Espeso,E.A., Penalva,M.A., & Arst,H.N., Jr. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* **30**, 259-264 (1998).
134. Negrete-Urtasun,S., Reiter,W., Diez,E., Denison,S.H., Tilburn,J., Espeso,E.A., Penalva,M.A., & Arst,H.N., Jr. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* **33**, 994-1003 (1999).
135. Tilburn,J., Sanchez-Ferrero,J.C., Reoyo,E., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics* **171**, 393-401 (2005).
136. Calcagno-Pizarelli,A.M., Negrete-Urtasun,S., Denison,S.H., Rudnicka,J.D., Bussink,H.J., Munera-Huertas,T., Stanton,L., Hervas-Aguilar,A., Espeso,E.A., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot. Cell* **6**, 2365-2375 (2007).
137. Galindo,A., Hervas-Aguilar,A., Rodriguez-Galan,O., Vincent,O., Arst,H.N., Tilburn,J., & Penalva,M.A. PalC, One of Two Bro1 Domain Proteins in the Fungal pH Signalling Pathway, Localizes to Cortical Structures and Binds Vps32. *Traffic* **8**, 1346-1364 (2007).
138. Peñalva,M.A., Tilburn,J., Bignell,E., & Arst,H.N., Jr. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16**, 291-300 (2008).
139. Arst,H.N., Jr. & Penalva,M.A. Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal. Genet. Biol.* **40**, 1-3 (2003).
140. Espeso,E.A., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956 (1993).
141. Espeso,E.A. & Penalva,M.A. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 28825-28830 (1996).
142. Hutchings,H., Stahmann,K.P., Roels,S., Espeso,E.A., Timberlake,W.E., Arst,H.N., Jr., & Tilburn,J. The multiply-regulated gabA gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: a score of exons. *Mol. Microbiol.* **32**, 557-568 (1999).
143. Espeso,E.A., Roncal,T., Diez,E., Rainbow,L., Bignell,E., Alvaro,J., Suarez,T., Denison,S.H., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**, 719-728 (2000).

144. MacCabe,A.P., Orejas,M., Tamayo,E.N., Villanueva,A., & Ramon,D. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *J. Biotechnol.* **96**, 43-54 (2002).
145. Mingot,J.M., Tilburn,J., Diez,E., Bignell,E., Orejas,M., Widdick,D.A., Sarkar,S., Brown,C.V., Caddick,M.X., Espeso,E.A., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1390-1400 (1999).
146. Díez,E., Alvaro,J., Espeso,E.A., Rainbow,L., Suarez,T., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* **21**, 1350-1359 (2002).
147. Espeso,E.A., Tilburn,J., Sanchez-Pulido,L., Brown,C.V., Valencia,A., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**, 466-480 (1997).
148. Orejas,M., Espeso,E.A., Tilburn,J., Sarkar,S., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622-1632 (1995).
149. Hervás-Aguilar,A., Rodriguez,J.M., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger Transcription Factor PacC. *J. Biol. Chem.* **282**, 34735-34747 (2007).
150. Peñas,M.M., Hervas-Aguilar,A., Munera-Huertas,T., Reoyo,E., Penalva,M.A., Arst,H.N., Jr., & Tilburn,J. Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot. Cell* **6**, 960-970 (2007).
151. Mingot,J.M., Espeso,E.A., Diez,E., & Penalva,M.A. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1688-1699 (2001).
152. Fernández-Martínez, J. Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
153. Hervás-Aguilar, America. Procesamiento proteolítico del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
154. Fernández-Martínez,J., Brown,C.V., Diez,E., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., Penalva,M.A., & Espeso,E.A. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* **334**, 667-684 (2003).
155. Then,B.K. & Brakhage,A.A. Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PACC. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 843-849 (1998).
156. Schmitt,E.K., Kempken,R., & Kuck,U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 508-518 (2001).
157. Lacadena,J., Martinez,d.P., Gasset,M., Patino,B., Campos-Olivas,R., Vazquez,C., Martinez-Ruiz,A., Mancheno,J.M., Onaderra,M., & Gavilanes,J.G. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 273-281 (1995).

158. Keller,N.P., Nesbitt,C., Sarr,B., Phillips,T.D., & Burow,G.B. pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **87**, 643-648 (1997).
159. Castrejon,F., Gomez,A., Sanz,M., Duran,A., & Roncero,C. The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot. Cell* **5**, 507-517 (2006).
160. Platara,M., Ruiz,A., Serrano,R., Palomino,A., Moreno,F., & Arino,J. The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 36632-36642 (2006).
161. Su,S.S. & Mitchell,A.P. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**, 67-77 (1993).
162. Futai,E., Maeda,T., Sorimachi,H., Kitamoto,K., Ishiura,S., & Suzuki,K. The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559-568 (1999).
163. Barwell,K.J., Boysen,J.H., Xu,W., & Mitchell,A.P. Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 890-899 (2005).
164. Serrano,R., Ruiz,A., Bernal,D., Chambers,J.R., & Arino,J. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**, 1319-1333 (2002).
165. Ruiz,A. & Arino,J. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot. Cell* **6**, 2175-2183 (2007).
166. Lamb,T.M., Xu,W., Diamond,A., & Mitchell,A.P. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 1850-1856 (2001).
167. Davis,D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* **44**, 1-7 (2003).
168. Li,M., Martin,S.J., Bruno,V.M., Mitchell,A.P., & Davis,D.A. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot. Cell.* **3**, 741-751 (2004).
169. Ramon,A.M. & Fonzi,W.A. Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot. Cell* **2**, 718-728 (2003).
170. Baek,Y.U., Martin,S.J., & Davis,D.A. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot. Cell* **5**, 1550-1559 (2006).
171. Villar,C.C., Kashleva,H., Nobile,C.J., Mitchell,A.P., & Dongari-Bagtzoglou,A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect. Immun.* **75**, 2126-2135 (2007).
172. Davis,D., Edwards,J.E., Jr., Mitchell,A.P., & Ibrahim,A.S. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **68**, 5953-5959 (2000).
173. Sanchez,A.A., Johnston,D.A., Myers,C., Edwards,J.E., Jr., Mitchell,A.P., & Filler,S.G. Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage in vitro. *Infect. Immun.* **72**, 598-601 (2004).

174. Bignell,E., Negrete-Urtasun,S., Calcagno,A.M., Haynes,K., Arst,H.N., Jr., & Rogers,T. The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol. Microbiol.* **55**, 1072-1084 (2005).
175. Schrettl,M., Bignell,E., Kragl,C., Joechl,C., Rogers,T., Arst,H.N., Jr., Haynes,K., & Haas,H. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* **200**, 1213-1219 (2004).
176. Rollins,J.A. The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 785-795 (2003).
177. Bignell,E., Negrete-Urtasun,S., Calcagno,A.M., Arst,H.N., Jr., Rogers,T., & Haynes,K. Virulence comparisons of *Aspergillus nidulans* mutants are confounded by the inflammatory response of p47phox^{-/-} mice. *Infect. Immun.* **73**, 5204-5207 (2005).
178. Caracuel,Z., Roncero,M.I., Espeso,E.A., Gonzalez-Verdejo,C.I., Garcia-Maceira,F.I., & Di Pietro,A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **48**, 765-779 (2003).
179. Ortoneda,M., Guarro,J., Madrid,M.P., Caracuel,Z., Roncero,M.I., Mayayo,E., & Di Pietro,A. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* **72**, 1760-1766 (2004).
180. Herranz,S., Rodriguez,J.M., Bussink,H.J., Sanchez-Ferrero,J.C., Arst,H.N., Jr., Penalva,M.A., & Vincent,O. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12141-12146 (2005).
181. Boysen,J.H. & Mitchell,A.P. Control of Bro1-Domain Protein Rim20 Localization by External pH, ESCRT Machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 Pathway. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1344-1353 (2006).
182. Rodríguez-Galán, Olga. Estudios Celular y Molecular del Complejo ESCRT-III de *Aspergillus nidulans* y su relación con la señalización de pH ambiental. 2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation
183. Lefkowitz,R.J. & Shenoy,S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-517 (2005).
184. Shenoy,S.K., Drake,M.T., Nelson,C.D., Houtz,D.A., Xiao,K., Madabushi,S., Reiter,E., Premont,R.T., Lichtarge,O., & Lefkowitz,R.J. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 1261-1273 (2006).
185. Nikko,E., Marini,A.M., & Andre,B. Permease Recycling and Ubiquitination Status Reveal a Particular Role for Bro1 in the Multivesicular Body Pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 50732-50743 (2003).
186. Odorizzi,G., Katzmann,D.J., Babst,M., Audhya,A., & Emr,S.D. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **116**, 1893-1903 (2003).
187. Sadoul,R. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol. Cell* **98**, 69-77 (2006).
188. Mattei,S., Klein,G., Satre,M., & Aubry,L. Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 925-936 (2006).

189. Fisher,R.D., Chung,H.Y., Zhai,Q., Robinson,H., Sundquist,W.I., & Hill,C.P. Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell* **128**, 841-852 (2007).
190. Bowers,K., Lottridge,J., Helliwell,S.B., Goldthwaite,L.M., Luzio,J.P., & Stevens,T.H. Protein-Protein Interactions of ESCRT Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **5**, 194-210 (2004).
191. Nickas,M.E. & Yaffe,M.P. BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2585-2593 (1996).
192. Springael,J.Y., Nikko,E., Andre,B., & Marini,A.M. Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett.* **517**, 103-109 (2002).
193. Futai,E., Kubo,T., Sorimachi,H., Suzuki,K., & Maeda,T. Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim. Biophys. Acta.* **1517**, 316-319 (2001).
194. Sorimachi,H. & Suzuki,K. The structure of calpain. *J. Biochem. (Tokyo).* **129**, 653-664 (2001).
195. Futai,E., Sorimachi,H., Jeong,S.Y., Kitamoto,K., Ishiura,S., & Suzuki,K. *Aspergillus oryzae* palBory encodes a calpain-like protease: homology to *Emericella nidulans* PalB and conservation of functional regions. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 438-440 (1999).
196. DeWire,S.M., Ahn,S., Lefkowitz,R.J., & Shenoy,S.K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol* **69**, 483-510 (2007).
197. Shenoy,S.K., Barak,L.S., Xiao,K., Ahn,S., Berthouze,M., Shukla,A.K., Luttrell,L.M., & Lefkowitz,R.J. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 29549-29562 (2007).
198. Mitchell,A.P. A VAST staging area for regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 7111-7112 (2008).
199. Scott,A., Gaspar,J., Stuchell-Brereton,M.D., Alam,S.L., Skalicky,J.J., & Sundquist,W.I. Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13813-13818 (2005).
200. McCullough,J., Fisher,R.D., Whitby,F.G., Sundquist,W.I., & Hill,C.P. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 7687-7691 (2008).
201. Ichioka,F., Kobayashi,R., Katoh,K., Shibata,H., & Maki,M. Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J.* **275**, 682-692 (2008).
202. Doyotte,A., Mironov,A., McKenzie,E., & Woodman,P. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 6308-6313 (2008).
203. Carlton,J.G. & Martin-Serrano,J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908-1912 (2007).
204. Morita,E., Sandrin,V., Chung,H.Y., Morham,S.G., Gygi,S.P., Rodesch,C.K., & Sundquist,W.I. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* **26**, 4215-4227 (2007).

205. Carlton,J.G., Agromayor,M., & Martin-Serrano,J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 10541-10546 (2008).
206. Morita,E. & Sundquist,W.I. Retrovirus budding. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 395-425 (2004).
207. Fujii,K., Hurley,J.H., & Freed,E.O. Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 912-916 (2007).
208. Lee,H.H., Elia,N., Ghirlando,R., Lippincott-Schwartz,J., & Hurley,J.H. Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science* **322**, 576-580 (2008).
209. Glotzer,M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735-1739 (2005).
210. Jin,Y., Mancuso,J.J., Uzawa,S., Cronenbold,D., & Cande,W.Z. The fission yeast homolog of the human transcription factor EAP30 blocks meiotic spindle pole body amplification. *Dev. Cell* **9**, 63-73 (2005).
211. Langelier,C., von Schwedler,U.K., Fisher,R.D., De,D., I, White,P.L., Hill,C.P., Kaplan,J., Ward,D., & Sundquist,W.I. Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* **80**, 9465-9480 (2006).
212. Yang,D., Rismanchi,N., Renvoise,B., Lippincott-Schwartz,J., Blackstone,C., & Hurley,J.H. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1278-1286 (2008).
213. Connell,J.W., Lindon,C., Luzio,J.P., & Reid,E. Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic.* (2008).
214. Martin-Serrano,J., Zang,T., & Bieniasz,P.D. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J. Virol.* **77**, 4794-4804 (2003).
215. Gladfelter,A.S., Pringle,J.R., & Lew,D.J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 681-689 (2001).
216. Douglas,L.M., Alvarez,F.J., McCreary,C., & Konopka,J.B. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryot. Cell* **4**, 1503-1512 (2005).
217. Fares,H., Goetsch,L., & Pringle,J.R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **132**, 399-411 (1996).
218. De Souza,C.P. & Osmani,S.A. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryot. Cell* **6**, 1521-1527 (2007).
219. De Souza,C.P.C., Osmani,A.H., Hashmi,S.B., & Osmani,S.A. Partial Nuclear Pore Complex Disassembly during Closed Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology* **14**, 1973-1984 (2004).
220. Harris,S.D. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 736-739 (2001).
221. Yang,D., Rismanchi,N., Renvoise,B., Lippincott-Schwartz,J., Blackstone,C., & Hurley,J.H. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1278-1286 (2008).
222. Connell,J.W., Lindon,C., Luzio,J.P., & Reid,E. Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic.* (2008).

223. Cove,D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **113**, 51-56 (1966).
224. Sambrook, J, Fritsch E.F., and Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 200. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. New York.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
225. Mooney,J.L. & Yager,L.N. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**, 1473-1482 (1990).
226. Clutterbuck,A.J. *Aspergillus nidulans*. (1990).
227. Harper,J.W., Adami,G.R., Wei,N., Keyomarsi,K., & Elledge,S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816 (1993).
228. James,P., Halladay,J., & Craig,E.A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436 (1996).
229. Yang,L., Ukil,L., Osmani,A., Nahm,F., Davies,J., De Souza,C.P., Dou,X., Perez-Balaguer,A., & Osmani,S.A. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*
1. *Eukaryot. Cell* **3**, 1359-1362 (2004).
230. Tilburn,J., Scazzocchio,C., Taylor,S.I., Zabicky-Zissman,J.H., Lockington,R.A., & Davies,R.W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **26**, 205-221 (1983).
231. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
232. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
233. Pluthero,F.G. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase
Nucleic Acids Res. **21**, 4850-4851 (1993).
234. Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., & Kimura,A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168 (1983).
235. Chien,C.T., Bartel,P.L., Sternglanz,R., & Fields,S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 9578-9582 (1991).
236. Miller,J.H. Experiments in molecular genetics. (**Cold Spring Harbor, New York**; 1972).
237. Jose Manuel Rodríguez Rodríguez. *Aspergillus nidulans*, un modelo para el estudio de metabolopatías humans. 2003.
Ref Type: Thesis/Dissertation
238. Peñalva,M.A. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 963-975 (2005).
239. Notredame,C., Higgins,D.G., & Heringa,J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217 (2000).

240. Nicholas,K.B., Nicholas H.B.Jr., & Deerfield,D.W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW. NEWS* **4**, (1997).
241. Hervás-Aguilar,A., Rodríguez,J.M., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., & Penalva,M.A. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J. Biol. Chem.* **282**, 34735-34747 (2007).
242. Missotten,M., Nichols,A., Rieger,K., & Sadoul,R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death. Differ.* **6**, 124-129 (1999).
243. Bateman,A., Birney,E., Cerruti,L., Durbin,R., Eddy,S.R., Griffiths-Jones,S., Howe,K.L., Marshall,M., & Sonnhammer,E.L. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 276-280 (2002).
244. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., & Lipman,D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410 (1990).
245. Tarassov,K., Messier,V., Landry,C.R., Radinovic,S., Molina,M.M., Shames,I., Malitskaya,Y., Vogel,J., Bussey,H., & Michnick,S.W. An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-1470 (2008).
246. Leung,K.F., Dacks,J.B., & Field,M.C. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*. (2008).
247. Uetz,P., Giot,L., Cagney,G., Mansfield,T.A., Judson,R.S., Knight,J.R., Lockshon,D., Narayan,V., Srinivasan,M., Pochart,P., Qureshi-Emili,A., Li,Y., Godwin,B., Conover,D., Kalbfleisch,T., Vijayadamodar,G., Yang,M., Johnston,M., Fields,S., & Rothberg,J.M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627 (2000).
248. Krogan,N.J. et al. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637-643 (2006).
249. Fisher,R.D., Chung,H.Y., Zhai,Q., Robinson,H., Sundquist,W.I., & Hill,C.P. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* **128**, 841-852 (2007).
250. Araujo-Bazán,L., Fernandez-Martinez,J., Rios,V.M., Etxebeste,O., Albar,J.P., Penalva,M.A., & Espeso,E.A. NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin alpha. *Fungal. Genet. Biol.* **45**, 278-291 (2008).
251. Lin,Y., Kimpler,L.A., Naismith,T.V., Lauer,J.M., & Hanson,P.I. Interaction of the Mammalian Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) III Protein hSnf7-1 with Itself, Membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J. Biol. Chem.* **280**, 12799-12809 (2005).
252. Lefkowitz,R.J. & Whalen,E.J. beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 162-168 (2004).
253. Kaksonen,M., Toret,C.P., & Drubin,D.G. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-320 (2005).
254. Walther,T.C., Brickner,J.H., Aguilar,P.S., Bernales,S., Pantoja,C., & Walter,P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998-1003 (2006).

-
255. Lee, S.C., Schmidtke, S.N., Dangott, L.J., & Shaw, B.D. *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot. Cell* **7**, 1278-1288 (2008).
256. Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodriguez, J.M., Galindo, A., & Penalva, M.A. Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic*. (2008).
257. Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J.P., Tani, K., & Hauri, H.P. Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J. Cell Sci.* **115**, 619-628 (2002).
258. Blanchin-Roland, S., Da Costa, G., & Gaillardin, C. Ambient pH signalling in the yeast *Yarrowia lipolytica* involves YIRim23p/PalC, which interacts with Snf7p/Vps32p, but does not require the long C terminus of YIRim9p/PalI. *Microbiology* **154**, 1668-1676 (2008).
259. Jaspersen, S.L. & Winey, M. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 1-28 (2004).
260. Doonan, J.H. Cell division in *Aspergillus*. *J. Cell Sci.* **103** (Pt 3), 599-611 (1992).
261. Yang, D., Rismanchi, N., Renvoise, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., & Hurley, J.H. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1278-1286 (2008).
262. Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., & Steinberg, G. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J.* **25**, 2275-2286 (2006).
263. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., & Gottlinger, H.G. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689-699 (2003).
264. Welsch, S., Habermann, A., Jager, S., Muller, B., Krijnse-Locker, J., & Krausslich, H.G. Ultrastructural analysis of ESCRT proteins suggests a role for endosome-associated tubular-vesicular membranes in ESCRT function. *Traffic*. **7**, 1551-1566 (2006).
265. Moseley, J.B. & Goode, B.L. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 605-645 (2006).
266. Ichioka, F., Horii, M., Katoh, K., Terasawa, Y., Shibata, H., & Maki, M. Identification of Rab GTPase-activating protein-like protein (RabGAPLP) as a novel Alix/AIP1-interacting protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 861-865 (2005).
267. Schweitzer, J.K., Burke, E.E., Goodson, H.V., & D'Souza-Schorey, C. Endocytosis Resumes during Late Mitosis and Is Required for Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 41628-41635 (2005).
268. Strickland, L.I. & Burgess, D.R. Pathways for membrane trafficking during cytokinesis. *Trends in Cell Biology* **14**, 115-118 (2004).
269. Bokel, C., Schwabedissen, A., Entchev, E., Renaud, O., & Gonzalez-Gaitan, M. Sara Endosomes and the Maintenance of Dpp Signaling Levels Across Mitosis. *Science* **314**, 1135-1139 (2006).
270. Knoblich, J.A. CELL BIOLOGY: Sara Splits the Signal. *Science* **314**, 1094-1096 (2006).
271. Osmani, A.H., Davies, J., Liu, H.L., Nile, A., & Osmani, S.A. Systematic Deletion and Mitotic Localization of the Nuclear Pore Complex Proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4946-4961 (2006).

BIBLIOGRAFÍA

272. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., & Sundquist, W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**, 55-65 (2001).
273. Sundquist, W.I., Schubert, H.L., Kelly, B.N., Hill, G.C., Holton, J.M., & Hill, C.P. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* **13**, 783-789 (2004).

ANEXO